

Utvikling av en sensitiv LC-MS/MS-metode for å kvantifisere midazolam og metabolitter i plasma fra sykkelig overvektige pasienter

Anders Ulvmoen



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2015

Utvikling av en sensitiv LC-MS/MS-metode for å kvantifisere midazolam og metabolitter i plasma fra sykkelig overvektige pasienter

Anders Ulvmoen



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Veiledere:

Professor Hege Christensen,

Avd. for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, UiO

Professor Monica Hermann,

Avd. for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, UiO

Postdoktor Ida Robertsen,

Avd. for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk institutt, UiO

© Anders Ulvmoen

2015

**"Utvikling av en sensitiv LC-MS/MS-metode for å kvantifisere midazolam
og metabolitter i plasma fra sykkelig overvektige pasienter"**

Forfatter: Anders Ulvmoen

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

FORORD

Denne masteroppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap. Arbeidet ble påbegynt i august 2014 og avsluttet i mai 2015.

Først og fremst vil jeg takke professor Hege Christensen som har vært positiv og støttende gjennom hele året. Tusen takk for uvurderlig hjelp før innlevering av oppgaven. Jeg vil også takke professor Monica Hermann som alltid ga hyggelige og konstruktive tilbakemeldinger når spørsmålene rundt analysemetoden ble mange. Tusen takk til Ida Robertsen for at du alltid var tilgjengelig til å hjelpe hver gang jeg kom og banket på døra med spørsmål. Overingeniør Siri Johannessen fortjener også en stor takk. Din erfaring og arbeidskapasitet har vært gull verdt hele året. Mange takk for praktisk hjelp på slutten når det ble mange baller i lufta på en gang. Jeg vil gjerne takke for alt dere har lært meg dette året gjennom å være positive og engasjerende!

Takk for nyttige innspill fra Anders Åsberg før vintermøtet og før innlevering av oppgaven. Jeg vil også gjerne takke alle farmakologi-ansatte i Gydas vei som har et godt arbeidsmiljø hvor jeg har følt meg velkommen. Jeg vil også benytte anledningen til å takke masterstudentene ved Gydas vei som har vært viktige for å holde moralen oppe med mye moro gjennom hele året.

Til slutt vil jeg takke venner og familie for støtte og oppmuntring gjennom 5 år med tunge studier.

Oslo, mai 2015

Anders Ulvmoen

FORKORTELSER

1-OH	1'-hydroksy
4-OH	4'-hydroksy
AU	«Arbitrary units»
AUC	Areal under kurven
BMI	«Body mass index»
C ₈ , C ₁₈	Octyl, octadecyl (stasjonærfase)
C _{max}	Maksimal plasmakonsentrasjon
CYP	Cytokrom P450
d ₆	Deuteriummerket
E _H	Hepatisk ekstraksjonsratio
EMA	European Medicines Agency
ESI	Elektrospray-ionisering
F	Biotilgjengelighet
G	Gravitasjonskraft
GB-operasjon	Gastrisk bypass-operasjon
IL-6	Interleukin 6
LC	Væskeskromatografi
LCD	Streng lavkaloridiett
LLE	Væske-væske-ekstraksjon
LLOD	Laveste detekterbare mengde
LLOQ	Laveste kvantifiserbare mengde
m/z	Masse over ladning-ratio
MeOH	Metanol
MRM	«Multiple reaction monitoring»
MS	Massespektrometri

MS/MS	Tandem-massespektrometri
N ₂ -gass	Nitrogengass
NF-κB	«Nuclear factor kappa B»
OATP1B1	«Organic anion-transporting polypeptide 1B1»
OC	«On column»
P-gp	P-glykoprotein
PK-dag	Farmakokinetikk-dag
pH	Surhetsgrad
pK _a	Syrekonstant
PXR	«Pregnane X-Reseptor»
QC	Kvalitetskontroll
R ²	Korrelasjonskoeffisient
RSD	Relativt standardavvik
S/N	Signal/støy-ratio
SLE	Supported væske-ekstraksjon
SPE	Fast fase-ekstraksjon
SRM	«Single reaction monitoring»
t _{1/2}	Halveringstid
TNFα	Tumornekrosefaktor alfa
VLCD	Veldig streng lavkaloridiett
v/v	Volum/volum

SAMMENDRAG

Introduksjon: Overvekt er et økende helsemessig problem, og fedmekirurgi har etablert seg som et effektivt behandlingsalternativ. I en tidligere studie er det funnet en økning i biotilgjengelighet av atorvastatin i gastrisk bypass-opererte pasienter. Cocktailstudien er en omfattende klinisk studie der effekt av fedmekirurgi og lavkaloridiett skal undersøkes på ulike legemidlers farmakokinetikk. Midazolam, som er et modellsubstrat for CYP3A, er et av legemidlene som skal brukes i studien. Både før og etter kirurgi/diett skal absolutt biotilgjengelighet av midazolam bestemmes. Hensikten med dette arbeidet var å utvikle en sensitiv metode for å kvantifisere midazolam og metabolittene 1- og 4-OH-midazolam i plasma ved hjelp av en LC-MS/MS-metode.

Metode: Siden det blir administrert lave doser av midazolam i cocktailstudien (totalt 2,5 mg), var det nødvendig å utvikle en mer sensitiv LC-MS/MS-metode for analyse av midazolam med utgangspunkt i en allerede validert LC-MS-metode. Det ble i metodeutviklingen utført sammenlignende forsøk med C₈- og C₁₈-kolonne og varierende sammensetninger av mobilfase A (ammoniumformiat- eller ammoniumacetatbuffer, 0,05 M, pH 4,4). Mobilfase B besto av 5% metanol i acetonitril. I tillegg ble ulike prøveopparbeidelsesmetoder som væske-væske-ekstraksjon, supported væske-ekstraksjon og fast fase-ekstraksjon undersøkt. Mobilfasehastighet var 40 µl/min og injeksjonsvolum var 10 µl. Deuteriummerket midazolam ble brukt som internstandard. Den utviklede metoden ble deretter validert med tanke på linearitet, stabilitet, presisjon og nøyaktighet. Videre ble det analysert plasmaprøver fra en pasient i cocktailstudien med den validerte metoden og en farmakokinetisk populasjonsmodell for midazolam ble brukt til å estimere absolutt biotilgjengelighet for denne pasienten.

Resultater: Midazolam oppfylte presisjons- og nøyaktighetsanbefalingen (<15 % avvik) ved alle konsentrasjoner for både intra- og interdagvariasjon. Midazolam hadde et presisjonsavvik mellom 0,8 til 8,3 % og nøyaktighetsavvik mellom -5,2 til 13,3 % fra sann verdi. Metoden viste tilfredsstillende presisjon av begge metabolittene (mellom 2,0 til 13,9 % avvik fra sann verdi) unntatt ved den laveste konsentrasjonen av 4-OH-midazolam. Interdag-nøyaktigheten av 4-OH-midazolam hadde et høyere avvik enn anbefalt ved alle analyserte konsentrasjoner. Linearitet ble vist for alle analyttene med en $R^2 > 0,995$. Nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ) for midazolam var 10 pg «on column» (1 ng/ml). LLOQ for 4-OH-midazolam og 1-OH-midazolam var 20 pg «on column» (2 ng/ml). I den endelige metoden ble det brukt C₈-

kolonne, som ga smalere topper enn C₁₈-kolonne. Ammoniumacetatbuffer ble valgt som mobilfase A på grunn av bedre bufferkapasitet enn ammoniumformiatbuffer ved ønsket pH. Til deteksjon ble det benyttet "Selected reaction monitoring" (SRM).

Konklusjon: Det er utviklet en LC-MS/MS-metode for å kvantifisere midazolam i plasma. Valideringsdata viste god linearitet, presisjon og nøyaktighet for midazolam og 1-OH-midazolam. For 4-OH-midazolam var interdag-nøyaktigheten utenfor anbefalt avvik ved alle analyserte konsentrasjoner. Analyse av plasmaprøver fra én pasient ga kvantifiserbare mengder av midazolam, men ikke av de to metabolittene. Ytterligere optimalisering er nødvendig for å kunne kvantifisere metabolittene i pasientprøver fra cocktailstudien.

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD.....	V
FORKORTELSER	VI
SAMMENDRAG	VIII
INNHALDSFORTEGNELSE	X
1 INNLEDNING	1
1.1 Interindividuell variabilitet i legemiddelrespons	1
1.1.1 Farmakokinetisk variabilitet.....	1
1.1.2 Biotilgjengelighet	2
1.1.3 Legemiddelmetabolisme	3
1.2 Sykelig overvekt	5
1.2.1 Fedme - en inflammasjonstilstand.....	6
1.2.2 Bariatrisk behandling av sykelig overvekt	7
1.3 Cocktailstudien	8
1.4 Midazolam	11
1.4.1 Farmakokinetikk.....	11
1.5 Prøveopparbeidelse.....	13
1.5.1 Væske-væske-ekstraksjon (LLE)	13
1.5.2 Supported væske-ekstraksjon (SLE)	13
1.5.3 Fast fase-ekstraksjon (SPE).....	14
1.6 LC-MS/MS	15
1.6.1 Kromatografisk separasjon.....	15
1.6.2 Massespektrometrisk deteksjon.....	15
1.7 Hensikt med oppgaven	16
2 MATERIALER OG METODE.....	17
2.1 Materialer.....	17
2.1.1 Kjemikalier.....	17
2.1.2 Utstyr.....	17
2.1.3 Løsninger.....	18
2.2 Metode	19
2.2.1 Opprinnelig LC-MS-metode	19
2.2.2 LC-MS/MS-betingelser	19

2.2.3	Endelig LC-metode	20
2.2.4	Sammenligning av ulike prøveopparbeidelsesmetoder.....	21
2.3	Validering	23
2.3.1	Utbytte	23
2.3.2	Linearitet	23
2.3.3	Intra- og interdag-presisjon og nøyaktighet	24
2.3.4	Stabilitet av midazolam og metabolitter i mobilfase A.....	24
2.3.5	Pasientprøve	25
3	RESULTATER	26
3.1	Metodeutvikling.....	26
3.1.1	LC-MS/MS-betingelser.....	26
3.1.2	Sammenligning av ulike prøveopparbeidelsesmetoder.....	27
3.2	Validering	29
3.2.1	Utbytteforsøk.....	29
3.2.2	Linearitet	29
3.2.3	Presisjon og nøyaktighet	32
3.2.4	Stabilitet av midazolam og metabolitter i mobilfase A.....	33
3.2.5	Pasientprøve	34
4	DISKUSJON	36
5	KONKLUSJON	40
	LITTERATURLISTE	41

1 INNLEDNING

1.1 Interindividuell variabilitet i legemiddelrespons

Individuell variabilitet i legemiddelrespons er en stor utfordring i klinisk praksis. Innad i en populasjon er det store forskjeller i respons og legemiddelkonsentrasjon når ulike individer får lik dose legemiddel. Noen pasienter kan ha god effekt av legemidlet, mens legemidlet kan være ineffektivt eller gi bivirkninger hos andre. Legemiddelresponsen blir bestemt både av konsentrasjonen av legemiddel på virkestedet (farmakokinetikk) og interaksjon mellom legemiddel og målprotein (farmokodynamikk). Årsakene til variasjon i legemiddelrespons kan enten være betinget av farmakodynamiske eller farmakokinetiske forskjeller hos pasientene på grunn av miljømessige, biologiske og genetiske variasjoner. Den komplekse variabiliteten i legemiddelrespons mellom individer gjør det utfordrende å finne den optimale dosen av et legemiddel, og tydeliggjør behovet for en mer individualisert behandling.

1.1.1 Farmakokinetisk variabilitet

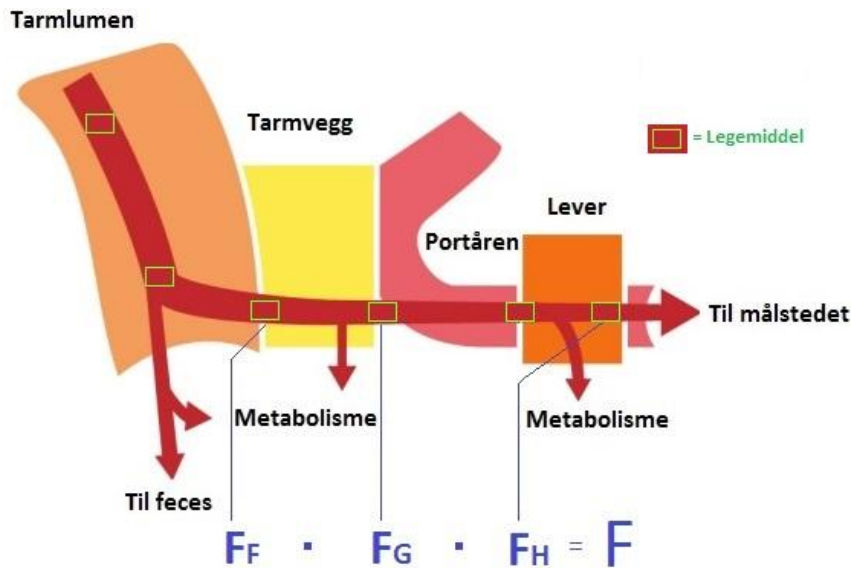
Farmakokinetikk er læren om hva som skjer med et legemiddel fra det administreres til det er fjernet fra kroppen, og beskriver forholdet mellom gitt dose og plasmakonsentrasjon av legemidlet [1]. Absorpsjon, distribusjon, metabolisme og eliminasjon (ADME) er sentrale prosesser i farmakokinetikken og individuelle ulikheter i disse prosessene bidrar til interindividuell variabilitet [2]. Mengde legemiddel som absorberes bestemmes av overflateareal, organets blodflow, legemidlets administrasjonsform, legemiddelkonsentrasjon på absorpsjonsstedet og legemidlets fysikalsk-kjemiske egenskaper (vannløselighet og membranpermeabilitet) [3]. Variasjon i absorpsjon av legemidler kan skyldes forskjeller i transittid i ventrikkelen, tarmmotilitet eller matinntak, og kan være en kilde til både intra- og interindividuell variasjon i farmakokinetikken til legemidler [1]. Etter absorpsjonen blir legemiddel distribuert fra blod og ut i vev. En fraksjon av legemidlet blir bundet til plasmaproteiner, mens den frie fraksjonen fører til farmakologisk virkning og gir ønsket respons [4]. Ulik proteinbindingsgrad kan derfor være en årsak til variasjon i distribusjonen av et legemiddel.

Lever og nyre er de to viktigste organene ansvarlige for eliminasjon av legemidler og metabolitter. Adekvat nyrefunksjon er nødvendig for eliminasjon av flere legemidler. Ved dårlig nyrefunksjon vil legemidler som i høy grad skilles ut av nyrene akkumuleres og gi variasjon i eliminasjon av legemidlet. Leveren har en sentral rolle i metabolismen av legemidler. Legemiddelmetaboliserende enzymer finnes i størst antall i leveren, men også i andre vev som blant annet i GI-traktus, lungene og i nyrene [4, 5]. Variasjon i metabolisme kan skyldes både arvelige og miljømessige faktorer [6].

For å nå virkestedet og utøve sin farmakologiske effekt blir de fleste legemidler transportert fra den systemiske sirkulasjonen og over biologiske membraner. Legemiddeltransportører er enten membranproteiner som er med på å pumpe ut avfallsstoffer og legemidler fra celler, eller opptakstransportører som bidrar til opptak av endogene substanser eller legemidler inn i celler. Denne transporten av legemidler er enten en passiv eller aktiv prosess [7]. De mest studerte transportørene er efflukstransportøren P-glykoprotein (P-gp), og opptakstransportøren OATP1B1 (Organic anion-transporting polypeptide 1B1). En hemming eller indusering av transportører kan føre til vesentlig variasjon i biotilgjengelighet og eliminasjon av enkelte legemidler [8].

1.1.2 Biotilgjengelighet

Over 70 % av legemidler gis peroralt [9], og det er viktig å undersøke farmakokinetiske data og biotilgjengeligheten til legemidler for å optimalisere behandling. Biotilgjengeligheten er den fraksjonen av legemidlet som når den systemiske sirkulasjonen og som kan gi ønsket effekt etter å ha blitt administrert [6]. Biotilgjengeligheten (F) til et legemiddel bestemmes av hvor stor fraksjon av dosen som når tarmcellene (F_F), fraksjonen som unngår nedbrytning i tarmveggen (F_G) og fraksjonen som unngår nedbrytning i lever (F_H) (Figur 1) [6]. Gastrointestinal motilitet kan være med på å påvirke biotilgjengelighet [10]. Mengden legemiddel som har blitt metabolisert i tarmveggen og i lever før det når systemkretsløpet er eliminert ved såkalt førstepassasje-metabolisme. Faktorer som er med på å regulere førstepassasje-metabolismen er enzymaktivitet og legemidlets binding til plasmaproteiner [10]. Jo høyere førstepassasje-metabolisme et legemiddel blir utsatt for, jo høyere peroral dose trenger man for å oppnå lik plasmakonsentrasjon som ved en intravenøs dose [10].



Figur 1. Perorale legemidler blir metabolisert i tarm og lever før de når systemkretsløpet. F_F : fraksjon av dose som når tarmcellene, F_G : fraksjon som unngår nedbrytning i tarmvegg, F_H : fraksjon som unngår nedbrytning i lever, F : total biotilgjengelighet. Modifisert figur fra [6].

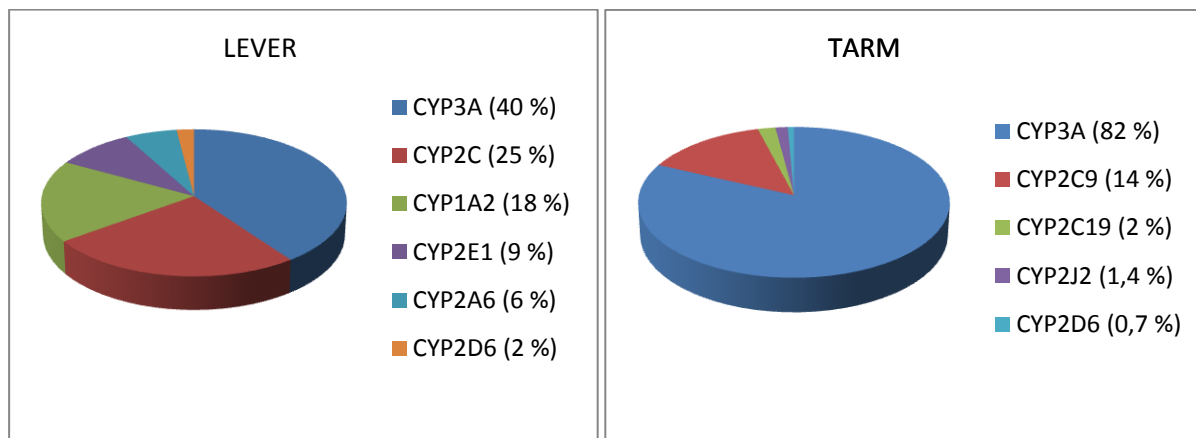
1.1.3 Legemiddelmetabolisme

Individuell variasjon i legemiddelmetabolisme er en viktig årsak til farmakokinetisk variabilitet av mange legemidler. Hovedfunksjonen til de legemiddelmetaboliserende enzymene er å katalysere reaksjoner som bidrar til at legemidlene omdannes til mer hydrofile substanser, slik at disse lettere blir eliminert fra kroppen. Enzymene deles inn i fase 1-enzymmer og fase 2-enzymmer. Fase 1-reaksjonene inkluderer oksidasjon, reduksjon og hydrolyse av molekylet. Funksjonelle polare grupper som blant annet -OH og -COOH innføres eller avdekkes i molekylet [11]. Dersom metabolitten ikke utskilles i urinen etter fase 1-metabolisme kan den metaboliseres av et fase 2-enzym. Fase 2-enzymene utnytter at det er innført eller avdekket O-, N- eller S-atomer på metabolitten. Disse atomene fungerer som akseptorer for hydrofile grupper som kobles på av fase 2-enzymene [11].

Cytokrom P450-enzymmer

Cytokrom P450 (CYP)-enzymssystemet er det viktigste legemiddelmetaboliserende enzymssystemet og er fase 1-enzymmer. Enzymene bryter også ned andre xenobiotika og bidrar i produksjonen av endogene stoffer som blant annet steroider, gallesyrer, fettsyrer og prostaglandiner. [12]. CYP-enzymene finnes i endoplasmatisk retikulum (ER) i cellene. CYP-

enzymene navngis etter hvilken familie, subfamilie og gennummer de tilhører. Det er funnet over 50 forskjellige CYP-enzymmer i mennesket og de 12 viktigste legemiddelmetaboliserende enzymene er i familiene 1-3 [11, 13]. Lever og tarm er de organene som uttrykker størst mengde CYP-enzymmer. Det er betydelig høyere mengde CYP-enzymmer i lever enn i tarm [5, 14].



Figur 2. Kvantitativ oversikt over CYP-enzymmer i henholdsvis lever og tarm. Prosentvise bidrag av CYP-enzymene er basert på totalt immunkvantifisert innhold av CYP-enzymmer [5, 14].

Mengden av enzymer og enzymets evne til å bryte ned legemidler varierer i stor grad og reguleres av mange faktorer. En av de viktigste faktorene er genetisk polymorfisme [15]. En mutasjon i et gen som koder for et legemiddelmetaboliserende enzym kan føre til enzymvarianter med ulik aktivitet. CYP2D6, CYP2C9 og CYP2C19 er CYP-enzymene hvor genetisk polymorfisme har vist seg å være av stor klinisk betydning [16]. Andre faktorer som kan føre til variabel legemiddelmetabolisme kan være alder, kjønn, kroppsvekt, sykdom, røyking og eventuelt samtidig inntak av andre legemidler [6].

CYP3A

CYP3A-enzymene er med på å metabolisere over 50 % av legemidlene som er på markedet. CYP3A er den kvantitativt største underfamilien og utgjør 40 % av total CYP-enzymmengde i leveren og 82 % av mengden CYP-enzymmer i tarm (Figur 2) [5, 14]. CYP3A4 er det CYP-enzymet som er mest uttrykt i lever med et gjennomsnitt på 30-40 % av leverens CYP-enzymmer [5, 17]. Det er stor individuell variabilitet i uttrykk og aktivitet av CYP3A4, noe som kan gi opphav ulik legemiddelrespons og toksisitet mellom individer. Det er funnet 10-40 ganger variasjon i uttrykk av funksjonelt CYP3A4 i voksne [18-20]. I motsetning til blant annet CYP2D6 er ingen nullalleler av CYP3A4 funnet [1, 21]. Det har imidlertid nylig blitt

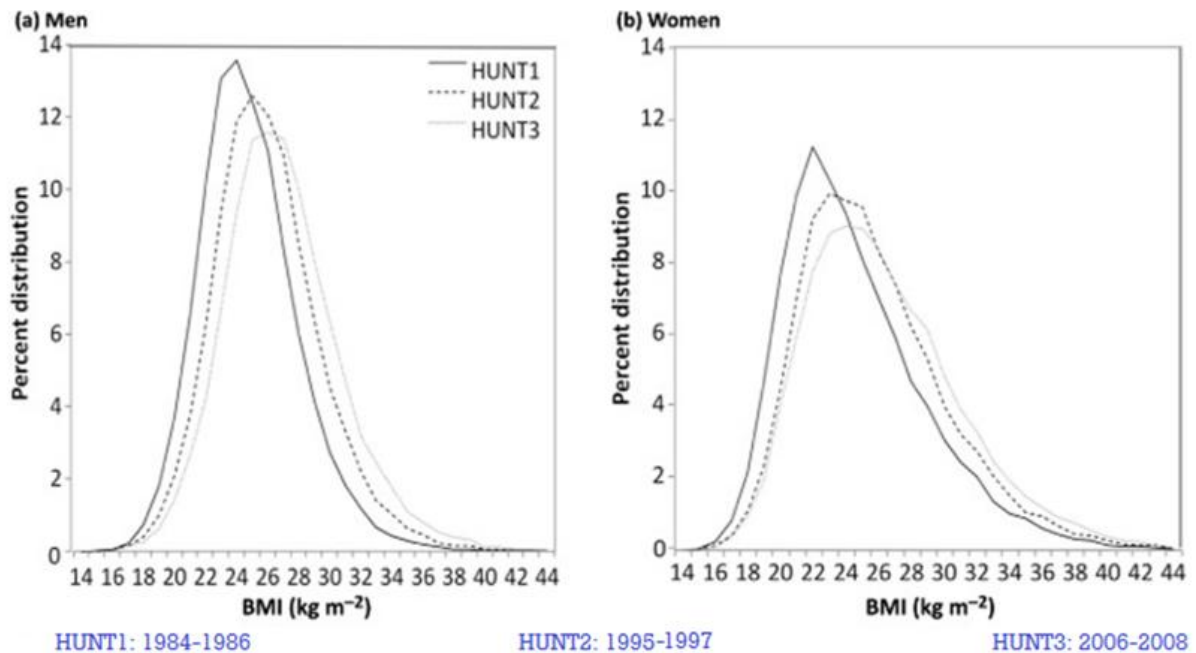
oppdaget at en enkelt nukleotid polyorfisme i *CYP3A4*-genet (*CYP3A4*22*) er assosiert med en redusert *CYP3A4*-aktivitet [22]. I en studie med 235 pasienter ble det undersøkt betydningen av *CYP3A4*22* for dosering av ulike typer statiner. Det var til sammen 22 (9,4 %) bærere av *CYP3A4*22*-allelet, og resultatene viste at disse individene trengte lavere doser av statiner for å oppnå optimal lipidkontroll sammenlignet med bærere av villtypeallelet *CYP3A4*1* [22]. Det har også blitt observert høyere plasmakonsentrasjon av midazolam i kreftpasienter (n = 108) som uttrykte *CYP3A4*22* sammenlignet med pasienter som uttrykte *CYP3A4*1* [23].

I tillegg til det godt dokumenterte *CYP3A4* er isoenzymene *CYP3A5*, *CYP3A7* og *CYP3A43* funnet i mennesket [1]. *CYP3A7* og *CYP3A43* er uttrykt i veldig liten grad og *CYP3A*-aktivitet blir sett på som summen av isoenzymene *CYP3A4* og *CYP3A5* [1]. *CYP3A5* er polymorft uttrykt og har en overlappende substratspesifisitet med *CYP3A4*, noe som gjør det vanskelig å undersøke enzymenes relative bidrag til metabolisme. Villtype-allelet *CYP3A5*1* gir økte nivåer av enzymet i lever og tarm og fører til økt clearance av *CYP3A*-substrater [17, 19]. Villtypeallelet er tilstede i mellom 10 og 30 % av leverne i den kaukasiske befolkningen [19]. De fleste leverne inneholder det ikke-funksjonelle allelet som fører til at *CYP3A5* ikke uttrykkes [24]. Individuer som uttrykker *CYP3A5*1* er rapportert å ha rundt 30-50 % av *CYP3A* bestående av *CYP3A5* [19, 25]. Antallet bærere av *CYP3A5*1* ser ut til å være høyere (40 % i kinesere og >50 % i afroamerikanere) i ikke-kaukasere [19]. Dette kan være en indikasjon på at ikke-kaukasere har en høyere clearance av *CYP3A*-legemidler og vil ha mindre risiko for overdosering av disse legemidlene enn kaukasere. Det er blant annet funnet en 250 % økning i clearance av *CYP3A*-substratet midazolam hos *CYP3A5*1*-bærere [19, 26]. I tillegg til de nevnte genetiske årsakene til variabilitet i evnen til å metabolisere legemidler via *CYP3A*, samt miljømessige forhold som blant annet legemiddelinteraksjoner, kan også sykdom- og inflammasjonstilstander påvirke aktiviteten av *CYP*-enzymene og dermed den systemiske eksponeringen av et *CYP3A*-substrat [27].

1.2 Sykelig overvekt

Sykdommer og sykelig overvekt kan være en årsak til varierende legemiddelrespons. Fettvev bidrar i produksjonen av cytokiner som kan være med på å endre metabolismen av legemidler fra normaltilstanden [27]. Sykelig overvekt defineres som en tilstand hvor man har en «Body mass index» (BMI) > 40 kg/m² eller > 35 kg/m² om personen i tillegg har en vektrelatert

tilleggsykdom. Tilleggsykdommene kan være diabetes type 2, hypertensjon, søvnapnè eller annen hjerte-/karsykdom [28]. Normal BMI regnes å være mellom $18,5 \text{ kg/m}^2$ til 25 kg/m^2 . Fra 1984 til 2008 økte gjennomsnitts-BMI hos menn fra $25,3 \text{ kg/m}^2$ til $27,5 \text{ kg/m}^2$. Hos kvinner var de samme tallene på $25,1 \text{ kg/m}^2$ til $26,9 \text{ kg/m}^2$ (Figur 3) [29]. Å være sykkelig overvektig bidrar i tillegg til å øke risikoen for å pådra seg de nevnte tilleggsykdommene.



Figur 3. I et utvalg av den norske befolkningen (total $n = 90\,000$) er det funnet en klar høyreforskyvning av den hyppigst forekommende BMI-verdien [29]. Distribusjonskurvene viser data fra 3 studier med 11 års mellomrom mellom hverandre. Kurve a) viser BMI blant kvinner, mens b) viser BMI blant menn i studiene.

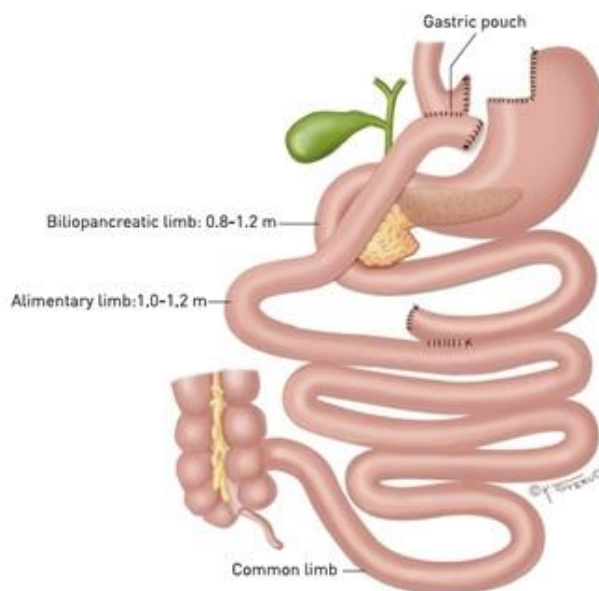
1.2.1 Fedme - en inflammasjonstilstand

Fedme er en slags inflammasjonstilstand hvor fettvevet spiller en viktig rolle med tanke på sykdomsutvikling. Økt mengde fettvev fører til økt produksjon av adipokiner som tumornekrosefaktor alfa ($\text{TNF}\alpha$) og interleukin-6 (IL-6), samt mindre utskillelse av adiponektin [30]. Cytokiner som $\text{TNF}\alpha$ og IL-6 er med på å øke produksjonen av NF- κB (« Nuclear factor kappa B»). NF- κB og PXR («Pregnane X-Reseptor») er involvert i å regulere transkripsjonen av CYP3A4, og induksjonen av NF- κB som skjer ved økt inflammasjon er vist å føre til nedregulering av CYP3A4 [27, 31]. Lavt nivå av adiponektin er forbundet med overvekt og insulinresistens (Figur 4) [30]. Det er mulig at individer med økt BMI har nedsatt uttrykk av CYP3A4 som følge av en høyere cytokinaktivitet. Dette kan føre

CONCLUSIONS

11

Det har tidligere blitt undersøkt CYP3A4-innhold i duodenum, ileum og jejunum hos 20 pasienter. I duodenum ble det funnet en medianverdi på 31 pmol/mg, mens det i jejunum og ileum ble funnet henholdsvis 23 og 17 pmol/mg [20]. Studien viste også en stor individuell variabilitet i CYP3A4-innhold [20]. Den delen av tarmen som kobles vekk ved GB antas følgelig å ha størst innhold av CYP3A4, og det er av stor interesse å studere hvordan GB-inngrepet påvirker biotilgjengeligheten av legemidler på både kort og lang sikt. Pasienter som har gjennomgått bariatrisk kirurgi ser ut til å variere i AUC (areal under kurven) og C_{max} (maksimal plasmakonsentrasjon) av CYP3A-substrater etter inngrepet [37-40]. Noen endelig konklusjon omkring økning eller reduksjon av legemiddelmetabolisme etter bariatrisk kirurgi er derfor ikke funnet.



Figur 5: Gastrisk bypass-inngrep [35].

1.3 Cocktailstudien

Cocktailstudien er et samarbeidsprosjekt mellom legemiddelfirmaet Astra Zeneca, Senter for sykkelig overvekt ved Vestfold sentralsykehus i Tønsberg og Universitetet i Oslo. Studien startet i mars 2015 og formålet er å undersøke hvordan legemidlers biotilgjengelighet og

metabolske parametre påvirkes av fedmekirurgi. Kirurgi-effekten skal sammenlignes med effekten hos sykkelig overvektige pasienter på lavkaloridiett og normalvektige pasienter. I tillegg skal det undersøkes om hvorvidt sykkelig overvekt fører til endret farmakokinetikk av legemidler som metaboliseres av ulike CYP-enzymmer eller som transporteres av P-gp og OATP1B1.

Bakgrunnen for å utføre cocktailstudien er observasjoner fra tidligere utførte studier hvor det er vist at biotilgjengeligheten av atorvastatin økte 6 uker etter fedmekirurgi for deretter å bli normalisert etter 2 år [32, 37, 39]. Det har i tillegg blitt funnet en invers sammenheng mellom BMI og CYP3A4-uttrykk i lever og tarm, samt en invers sammenheng mellom BMI og oral atorvastatin lakton-clearance [33]. Disse funnene har økt interessen for hvordan legemidler absorberes og metaboliseres ved økende vekt. I cocktailstudien skal det derfor undersøkes hvilke roller sentrale CYP-enzymmer og transportører har i bestemmelsen av biotilgjengelighet, og å undersøke om det er vektreduksjon i seg selv eller fedmekirurgi som kan være årsak til en forandring i biotilgjengelighet. I studien skal biotilgjengelighet og metabolisme av fem ulike legemidler, i tillegg til koffein, undersøkes. Legemidlene som skal undersøkes i studien er modellsubstrater på ulike CYP-enzymmer og transportører, og er listet i Tabell 1.

Tabell 1: Modellsubstratene som skal studeres i cocktailstudien.

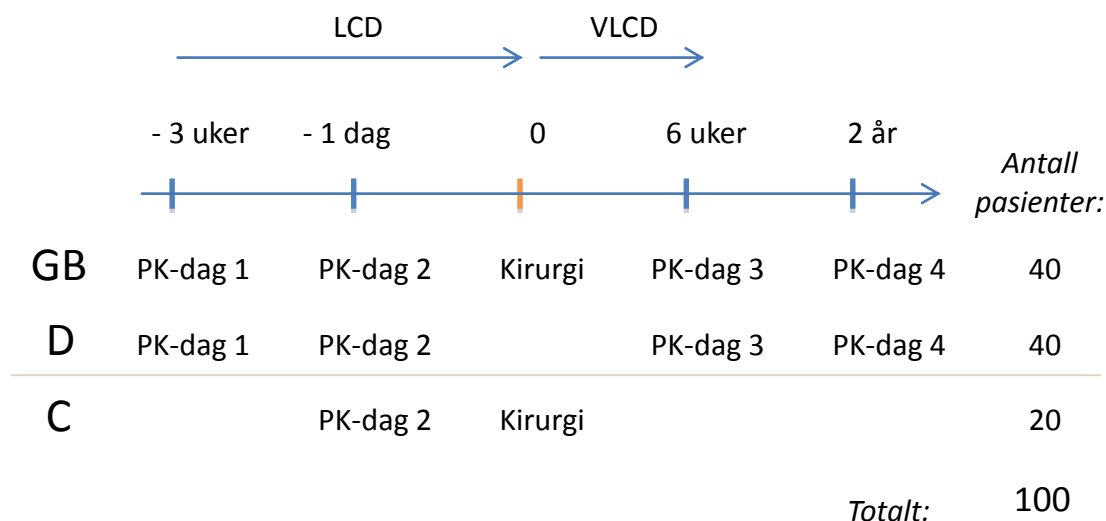
Substrat	Probe på
Koffein	CYP1A2
Losartan	CYP2C9
Omeprazol	CYP2C9
Midazolam	CYP3A4
Rosuvastatin	OATP1B1
Dlgoxin	P-gp

For å få mest mulig informasjon om CYP3A-aktiviteten i pasientene skal det også måles konsentrasjoner av biomarkøren 4 β -hydroksykolesterol som er en metabolitt av kolesterol. Denne metabolitten er en god markør for å finne endringer i CYP3A-metabolisme over tid [41]. Det vil i tillegg bli tatt vevsprøver fra jejunum-mucosa for å bestemme individuell CYP3A-aktivitet.

Studiedesign

Cocktailstudien er en ikke-randomisert, tre-armet studie i sykkelig overvektige pasienter, og totalt 100 pasienter skal inkluderes i studien (Figur 6). Førte pasienter skal gjennomgå GB-operasjon ved dag 0 (Gruppe GB), mens 40 pasienter settes på en lavkaloridiett (Gruppe D). GB og D-gruppen skal gjennom 4 farmakokinetikkdager (PK-dag) hvor det tas hyppige blodprøver i løpet av 24 timer etter inntak av legemidlene. Begge gruppene skal i 3 uker før dag 0 gjennomgå en lavkaloridiett (LCD) bestående av 800-900 kilokalorier (kcal) daglig. Fra dag 0 og i 6 uker fremover settes D-gruppen på en ny lavkaloridiett bestående av 500-800 kcal daglig (VLCD). Den tredje gruppen er en kontrollgruppe (Gruppe C) og består av 20 pasienter som skal gjennomgå en galleoperasjon på dag 0. Pasientene i C-gruppa skal ha en normal BMI og skal ikke på noen form for diett.

Farmakokinetikken til de ulike legemidlene skal undersøkes 3 uker før GB-operasjon for å undersøke metabolismen før livsstilsendringen. Deretter gjøres det samme dagen før, 6 uker etter og 2 år etter livsstilsendringen (kirugi eller diett) for å sammenligne langtidseffektene. I kontrollpasientene skal det kun utføres en PK-dag som er dagen før galleoperasjonen.



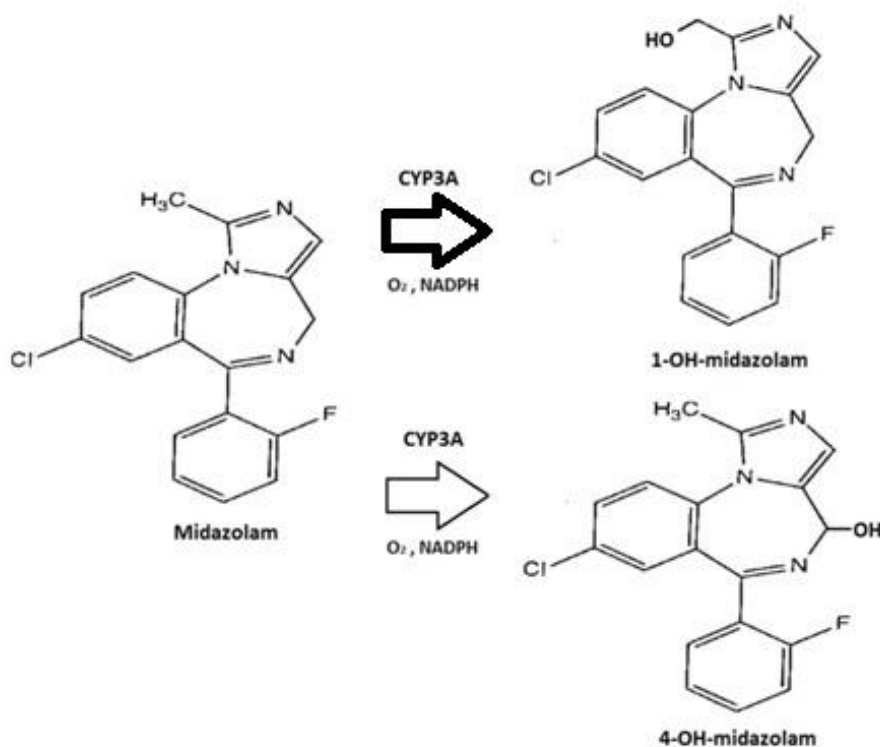
Figur 6: Studiedesign av cocktailstudien. GB-pasientene vil gjennomgå operasjon ved dag 0. Både GB- og D-gruppen skal gjennomgå LCD. GB: gastrisk bypass-pasienter, D: pasienter på diettkontroll, C: galleopererte pasienter, LCD: streng lavkaloridiett, VLCD: veldig streng lavkaloridiett, PK-dag: farmakokinetikkdag.

1.4 Midazolam

Midazolam er et korttidsvirkende benzodiazepin som har en hypnotisk og sederende effekt. Ved lavere doser har legemidlet en angstdempende, antikonvulsiv og muskelrelakserende effekt. Midazolam brukes også som premedikasjon før innledning av anestesi [42]. I tillegg er midazolam foretrukket modells substrat (probe) for å studere CYP3A-aktivitet både *in vivo* og *in vitro* [43-45]. I cocktailstudien blir midazolam gitt for å studere CYP3A-aktiviteten i pasientene, og legemidlet blir administrert på alle PK-dagene i en peroral dose på 1,5 mg før det gis en intravenøs dose på 1,0 mg 4 timer etter. Dette gjør det mulig å beregne en absolutt biotilgjengelighet. Den totale døgndosen som gis blir sett på som nedre nivå av klinisk brukbar dose.

1.4.1 Farmakokinetikk

Midazolam metaboliseres via CYP3A hovedsakelig til den aktive metabolitten 1-OH-midazolam, og i mindre grad til 4-OH-midazolam (Figur 7). Førstepassasje-metabolismen til midazolam er høy. Ved peroral administrasjon når 40-50 % av dosen det systemiske kretsløpet og vil kunne virke på målstedet [42, 46]. Metabolittene blir i størst grad glukuronidert, men metaboliseres også i mindre grad til 1,4-OH-midazolam [43]. Nyrene skiller ut 60-80 % glukuronidert midazolam og > 1 % uomdannet midazolam [47]. Midazolam bindes i høy grad til plasmaproteiner (95 ± 2 %) og normal halveringstid er på 1,5-3,5 timer [47, 48]. Det er betydelig interindividuell variabilitet i systemisk og oral clearance av midazolam, og i friske frivillige forsøkspersoner ($n = 57$) er det rapportert en 6 ganger forskjell i systemisk clearance (2,6-15,2 ml/min/kg) og en 10 ganger forskjell i oral clearance (6,1-64,8 ml/min/kg) [49].



Figur 7 Midazolam metaboliseres via CYP3A til 1-OH-midazolam og 4-OH-midazolam.

Flere av egenskapene til midazolam gjør dette legemidlet til en anerkjent probe på CYP3A-aktivitet. En probe er en markør som viser tilstedeværelse eller kvantifisering av et enzym. For å være egnet som probe bør substratet ha en relativt lav hepatisk ekstraksjonsratio (E_H), hovedsakelig bli metabolismert i lever og kunne administreres intravenøst [48]. Midazolam kan administreres intravenøst og blir metabolisert av CYP3A i lever og i tarm. Gjennomsnittlig hepatisk ekstraksjonsratio (E_H) for midazolam er 0,5, men denne utviser betydelig interindividuell variabilitet [48]. Den korte halveringstiden til midazolam gjør at estimering av AUC og andre målbare farmakokinetiske parametre tar kortere tid enn ved å bruke atorvastatin ($t_{1/2}$ = 10,9 timer) som er en annen probe på CYP3A [50]. En annen fordel ved midazolam som probe er at substansen ikke er substrat for transportører eller andre CYP-enzymmer. Midazolam metaboliseres mer selektivt enn atorvastatin og blir derfor sett på som en bedre probe på CYP3A [32, 44]. Det er tidligere funnet en høy korrelasjon mellom mengden av CYP3A-enzymmer *in vitro* med både mengden av metabolitten 1-OH-midazolam ($r = 0.84$, $p < 0,01$) og *in vivo* midazolam-clearance ($r = 0.93$, $p < 0,001$) i levertransplanterte pasienter [51]. I en studie med friske frivillige ble det vist en økning i midazolam-clearance når CYP3A-induseren rifampicin ble brukt samtidig [52]. Disse studiene viser at clearance av

midazolam og midazolamkonsentrasjon i blod er sensitiv for forandringer i CYP3A-aktivitet, noe som indikerer at midazolam vil være egnet til å bestemme CYP3A-aktiviteten både *in vivo* og *ex vivo* i tarmbiopsier fra pasientene i cocktailstudien [51].

1.5 Prøveopparbeidelse

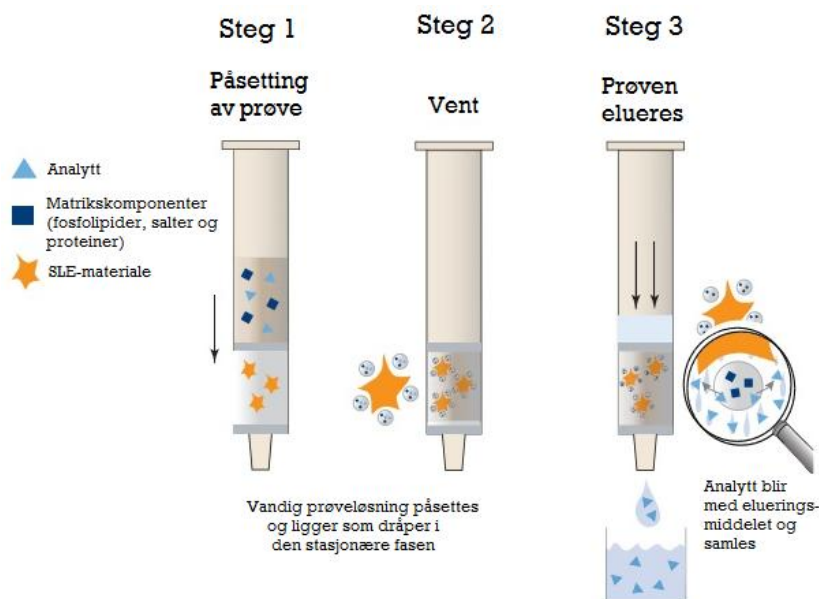
For å analysere legemidler i biologiske materialer er det nødvendig med en prøveopparbeidelse av analyttene. Biologiske matrikser er ofte komplekse og inneholder forurensninger som ikke bør innføres i analyseapparatet. I tillegg forekommer gjerne analytten i lave konsentrasjoner. pH i kroppsvæsken har mye å si for hvor mye stoff som ekstraheres ut. Midazolam har en pKa-verdi på 6,2 [53]. pKa-verdien indikerer når stoffet er like mye protonert som uprotonert, altså i et forhold 1:1. Midazolam er en svak base og vil bli mindre protonert jo høyere pH-verdien i løsningen er. Denne egenskapen utnyttes ved prøveopparbeidelse av legemidlet.

1.5.1 Væske-væske-ekstraksjon (LLE)

I en klassisk væske-væske-ekstraksjon (LLE) utnytter man hvordan legemidler vil fordele seg mellom to ikke-blandbare væsker [54]. Legemiddelmolekyler har som oftest en hydrofob karakter og vil ved optimal pH ha en nøytral karakter og løse seg i det beste løsemiddelet for legemidlet - i den organiske fasen.

1.5.2 Supported væske-ekstraksjon (SLE)

Supported væske-ekstraksjon (SLE) minner om væske-væske-ekstraksjon, bortsett fra at den vandige fasen er stasjonær. Etter prøvепåsetting vil analytt og matrikskomponenter ligge som dråper og omringe SLE-materialet som består av jordarten kiselgur [55] (Figur 8). Når elueringsmiddelet tilsettes vil analytten ekstraheres ut, mens dråpene med matrikskomponenter fortsatt vil være bundet til kolonnematerialet [56]. SLE er mindre tidkrevende enn klassisk fast fase-ekstraksjon fordi kolonnematerialet ikke må kondisjoneres, og det er ikke nødvendig å vaske ut de hydrofile matrikskomponentene før elueringsstrinnet. Fordelen med SLE sammenlignet med LLE er at løsemiddelet ikke kommer i direkte kontakt med kolonnematerialet, noe som kan føre til emulgering ([55, 57]



Figur 8: Supported væske-ekstraksjon [56]. Prøven settes direkte på kolonnen (steg 1). Analytter og matrikskomponenter ligger som dråper uten å være i direkte kontakt med SLE-materialet (steg 2). Analytter blir med det organiske elueringsmiddelet ut av kolonnen (steg 3).

1.5.3 Fast fase-ekstraksjon (SPE)

I fast fase-ekstraksjon (SPE) suges prøveløsningen gjennom en sorbent som oftest består av en hydrofob karbonkjede. I en omvendt-fase-ekstraksjon vil funksjonelle grupper på de hydrofobe substansene interagere med sorbenten og retarderes. Først kondisjoneres sorbenten med metanol for å øke det aktive overflatearealet slik at den skal kunne fange opp og binde analyttene [58]. Ved påsetting av prøveløsningen er målet at analytten fullstendig fanges opp av kolonnematerialet. Prøveløsningen bør ha en veldig svak elueringsstyrke slik at interaksjonene mellom sorbent og prøve er sterkere. Forurensninger som er svakere bundet til sorbenten enn det analytten er, vaskes ut med en vaskeløsning. Vaskeløsningen må ha en sterkere elueringsstyrke enn prøveløsningen, men ikke være så sterk at analytten vaskes ut. Til slutt benyttes et løsemiddel med høy elueringsstyrke for å få med analytten ut fra kolonnen. Elueringsløsningen skal ha tilstrekkelig stor løsemiddelstyrke til å bryte all interaksjon mellom analytt og sorbent, men samtidig ikke være altfor sterk for å unngå å få med mer hydrofobe forurensninger enn analytten i ekstraktet [58].

1.6 LC-MS/MS

1.6.1 Kromatografisk separasjon

Væskekromatografi brukes til å bestemme konsentrasjon og tilstedeværelse av legemidler i biologisk materiale eller i farmasøytiske preparater. Mobilfasen består av en væske som har til hensikt å transportere analytter gjennom et kolonnemateriale som skal retardere og separere analyttene. Væsken består av en vandig bufferløsning med et organisk løsningsmiddel som er blandbar med vann (f.eks. acetonitril eller metanol). Som oftest blir det benyttet omvendt-fase-kromatografi som vil si at kolonnematerialet er hydrofobt. Et stort flertall av legemidler er i uprotonert form hydrofobe og vil retarderes til kolonnematerialet ved hjelp av "van der Waals"-krefter [58]. Det minst hydrofobe stoffet vil interagere minst med kolonnematerialet, følge den vandige bufferløsningen og få den korteste retensjonstida.

1.6.2 Massespektrometrisk deteksjon

Ved en massespektrometrisk deteksjon blir analyttene separert etter forholdet mellom masse (m) og ladning (z), kalt masse over ladning-ratio (m/z), i et magnetisk eller elektrostatisk felt. Massespektrometeret består av tre deler: ioniseringskilden hvor analytten blir ionisert og omdannet til gassfase, masseanalysatoren hvor det måles et m/z -forhold og detektoren hvor antall ioner med m/z -forholdet blir detektert [59]. For å detektere analyttene må de befinne seg som ioner i gassform. Den mest brukte metoden er elektrospray-ionisering (ESI), som omdanner analyttene fra væskefase til gassfase ved hjelp av et sterkt elektrisk felt under atmosfærisk trykk [60]. Væskestrømmen med protonerte eller deprotonerte stoffer føres fra væsekromatografi-kolonnen (LC-kolonnen) inn i ioniseringskilden via et kapillærrør. ESI utføres i positiv eller negativ mode, avhengig av kapillærets ladning [58]. Det påføres en høyspenning over kapillæret og før mobilfasen med analyttene når masseanalysatoren kommer den i kontakt med nitrogen [61]. Denne kontakten gjør at det dannes en aerosol av ioniserte dråper som blir sendt inn i masseanalysatoren [60]. Ioniseringen av analyttene kan gjøre at molekylene fragmenterer til mindre molekyler. Ionefelle-massespektrometri (MS) samler ionene ved hjelp av spenning over ringelektrodene og heliumgass [60]. Om spenningen og tilhørende frekvens endres, vil ioner med ønsket frekvens bli detektert. Ved tandem MS (MS/MS) vil man kunne fragmentere analyttene ytterligere ved å få ionene til å kolliderer med heliumgass [62]. De ioniserte analyttene separeres etter masse/ladningsforhold

(m/z) og mengden av ioner registreres av detektoren. Når de ønskede ionene er detektert vil man kunne analysere ett (Single reaction monitoring, SRM) eller flere (Multiple reaction monitoring, MRM) m/z -forhold [62, 63].

1.7 Hensikt med oppgaven

Hensikten med dette arbeidet er å utvikle en ny og sensitiv LC-MS/MS-metode for å kvantifisere midazolam og dens metabolitter i plasma. Metoden skal brukes i cocktailstudien for å beregne absolutt biotilgjengelighet av midazolam i sykelige overvektige pasienter.

2 MATERIALER OG METODE

2.1 Materialer

2.1.1 Kjemikalier

Kjemikalie	Leverandør
1-OH-midazolam	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4-OH-midazolam	Sigma-Aldrich, MO, USA
Acetonitril (Hypergrade for LC-MS)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ammoniakk 25 % (NH ₃) (Suprapur)	Merck, Tyskland
Eddiksyre 100 % (CH ₃ COOH) (Suprapur)	Merck, Tyskland
Etylacetat 99,7 % (C ₄ H ₈ O ₂)	Sigma-Aldrich, MO, USA
Metanol (CH ₃ OH) (Hypergrade for LC-MS)	Merck, Tyskland
Midazolam	Sigma-Aldrich, MO, USA
Midazolam-d6 (intern standard)	Toronto Research Chemicals, Ontario, Canada
Nitrogengass (N ₂)	AGA Progas A/S, Oslo, Norge

2.1.2 Utstyr

Utstyr	Leverandør
Aquasil C18, 100 x 1 mm, 3 µm	Thermo Scientific, IL, USA
Autoinjektor	Dionex Ultimate 3000, Thermo Scientific, USA
Biobasic-8, 50 x 1 mm, 3 µm (LC-kolonne)	Thermo Scientific, IL, USA
BioBasic-8 Guard, 10x1 mm, 5 µm (forkolonne)	Thermo Scientific, IL, USA
Chromabond XTR (SLE-kolonne)	Macherey Nagel, Düren, Tyskland
Corning sentrifugerør (15 og 50 ml)	Corning Inc., MA, USA
Datasystem	«Chromeleon Xpress» og «Xcalibur», Thermo Scientific
Detektor	LTQ XL, Thermo Scientific, USA
Eppendorfrør (1,5 og 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Heraeus Megafuge 16R-sentrifuge	Thermo Scientific, IL, USA
Hetteglass	Nerliens Meszansky, Oslo, Norge
Lokk til hetteglass	Nerliens Meszansky, Norge

Micro inserts	VWR International, Tyskland
Milli-Q Integral, Q-Pod (Vann til MS-analyser)	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Oasis HLB 1cc (30 mg)	Waters, Milford, MA, USA
pH-meter Beckman 50	Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA
Pipetter	VWR International, Tyskland
Pipettespisser (Biohit)	Sartorius, Göttingen, Tyskland
Pipettespisser (Finntip)	VWR International, Tyskland
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim, Tyskland
Vakuum-manifold	Thermo Scientific, IL, USA
Whirlmikser MS 3 Basic	IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA

2.1.3 Løsninger

Mobilfase A

0,05 M ammoniumacetatbuffer, pH = 4,4

Kjemikalie	Volum
Ammoniakk 25 %	1,4 ml
Eddiksyre 100 %	3,2 ml
Acetonitril (Hypergrade for LC-MS)	50,0 ml
Vann til MS-analyse	950,0 ml

Mobilfase B

Acetonitril 95 % Metanol 5 %

Kjemikalie	Volum
Acetonitril (Hypergrade for LC-MS)	950 ml
Metanol (Hypergrade for LC-MS)	50 ml

0,5 M ammoniumhydroksid (NH₄OH), pH = 11,8

Kjemikalie	Volum
Ammoniakk 25 %	95 ml
Vann til MS-analyse	5 ml

2.2 Metode

2.2.1 Opprinnelig LC-MS-metode

Utgangspunktet for dette arbeidet var en tidligere validert LC-MS-metode til analyse av 1-OH-midazolam og 4-OH-midazolam i prøver fra humane levermikrosomer [64]. I metoden ble det benyttet en omvendt fase C₈-kolonne (Inertsil, 50×3 mm, 5 µm, Varian, CA, USA). Mobilfaser som ble brukt var A: 0,05 M ammoniumformiatbuffer (pH=4,4) og B: acetonitril:metanol 95:5. Midazolam ble ikke kvantifisert. Diazepam ble brukt som intern standard. Deteksjon av analyttene ble utført med en enkel kvadrupol som masseanalysator. Injeksjonsvolumet var på 20 µl og nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ) ble målt til å være rundt 0,5 ng «on column» (OC) for begge metabolittene. Ettersom midazolam ikke ble kvantifisert med den opprinnelige metoden, prøvematriks var endret og LLOQ var antatt å være for høy [65] for kvantifisering av midazolam og metabolitter hos pasienter etter enkeltdose midazolam, var det nødvendig med modifisering av den opprinnelige metoden.

2.2.2 LC-MS/MS-betingelser

Deteksjon

Det ble besluttet å benytte tandem MS (LTQ XL, Thermo Scientific) for å øke sensitiviteten i forhold til den opprinnelige metoden [64]. Som intern standard ble midazolam-d₆ (Toronto Research Chemicals, Ontario, Canada) brukt. «Tuning» av betingelser for tandem MS-deteksjon ble utført ved kontinuerlig infusjon av midazolam, metabolittene og intern standard hver for seg i en konsentrasjon på 500 ng/ml gjennom en «T-connector». «Tuning» ble gjort for å undersøke hvilke fragmentioner MS-en spaltet analyttene til i størst grad. Det ble benyttet en blanding av 85 % mobilfase A og 15 % mobilfase B som ble levert med mobilfasehastighet på 40 µl/min. Betingelser ble optimalisert for deteksjon av produktionet som ga størst intensitet for hvert av analyttene. ESI ble utført i positiv mode. Til deteksjon i den endelige metoden ble det brukt SRM.

Kromatografi

Innledende forsøk ble utført med C₈-kolonne (BioBasic-8, 50 x 1 mm, 3 µm, Thermo Scientific, IL, USA) og C₁₈-kolonne (Aquasil C18, 100 x 1 mm, 3 µm, Thermo Scientific, IL,

USA). Forskjell i retensjonstid, bredde og form på toppene ble sammenlignet. Ammoniumformiat- og ammoniumacetatbuffer ble testet for å finne ut hvilken buffer som egnet seg best som mobilfase A. I tillegg ble det gjort forsøk med varierende bratthet på gradienten med mobilfase B for å oppnå passende retensjonstider og smale topper.

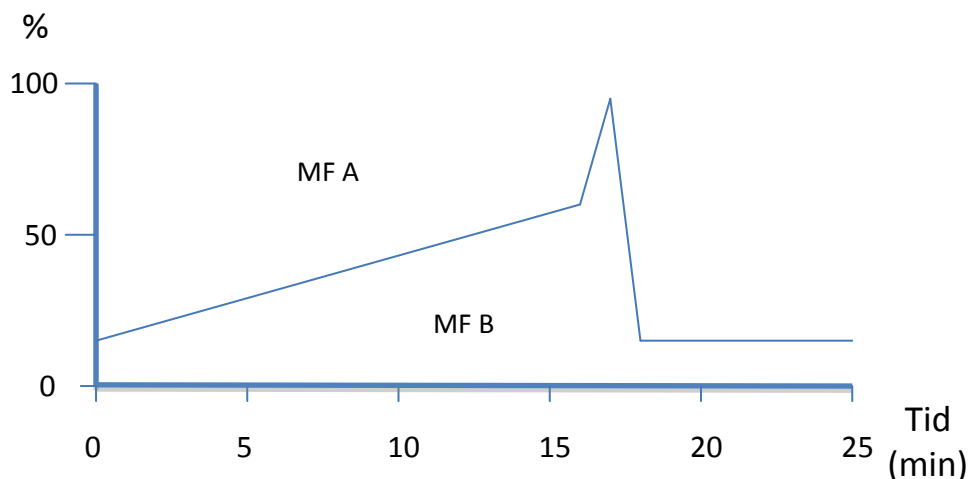
Ved injeksjon av samme prøve flere ganger ($n = 5$) var relative standardavvik for topphøyder og areal i kromatogrammene sammenlignbare ved bruk av C₈-kolonne. Substansene ble løst i mobilfase og analysert for å bestemme om topphøyde eller areal ga minst relativt standardavvik ($n = 5$). I alle videre forsøk ble det benyttet topphøyde til kvantifisering av analyttene.

2.2.3 Endelig LC-metode

Til den endelige metoden ble det benyttet ESI-ioniseringskilde i positiv mode, masseanalysator i form av en lineær ionefelle og tandem MS som detektor. Til kromatografi av analyttene ble C₈-kolonne valgt. Til validerings- og pasientprøve-analyser ble det i tillegg benyttet forkolonne (BioBasic-8 Guard, 10 x 1 mm, 5 µm, Thermo Scientific, Rockford, USA). Andel mobilfase B startet på 15 % og økte gradvis til 60 % de 16 første minuttene (Tabell 2, Figur 9). Deretter økte andelen raskt til 90 % det neste minuttet. Fra 17-18 minutter ble andelen redusert fra 90 % til 15 % og holdt stabilt på 15 % ut analysetiden på 25 minutter. Mellom 18 og 23 minutter ble mobilfasehastigheten økt fra 40 µl/min til 80 µl/min. Injeksjonsvolumet i alle analyser var på 10 µl. Den grafiske fremstillingen i Figur 9 ble laget med data fra Tabell 2.

Tabell 2: Mobilfasehastighet og prosentvis sammensetning av mobilfasene i analysen.

Analysetid (min)	Mobilfase-hastighet (µl/min)	% mobilfase B	% mobilfase A
0,0	40	15	85
16,0	40	60	40
17,0	40	90	10
18,0	40	15	85
18,2	80	15	85
23,0	80	15	85
25,0	40	15	85



Figur 9: Prosentvis sammensetning av mobilfase A og B i løpet av analysen.

2.2.4 Sammenligning av ulike prøveopparbeidelsesmetoder

Det ble utført prøveopparbeidelse med tre ulike metoder; LLE, SLE og SPE (Tabell 3). Plasma ble, før tilsetning av analyttene, sentrifugert ved 700 G i 5 minutter. Alle prøvene ble tilsatt intern standard i en konsentrasjon på 10 ng/ml.

LLE

Det ble tilsatt 30 µl ammoniakk til 1,2 ml plasma, og 100 µl pH-justert plasma (pH = 10,1) ble tilsatt i 8 rør før rørene ble tilsatt midazolam og metabolitter med konsentrasjon 2 ng/ml (n = 4) eller 20 ng/ml (n = 4). Etylacetat ble tilsatt i et volum på 100 µl 3 ganger, og organisk fase ble samlet mellom hver gang. Etter hver tilsetning av etylacetat ble prøven ristet lett. N₂-gass ble brukt for å dampe av etylacetat etter elueringen. Prøvene ble reløst i 50 µl mobilfase A. Utbyttet ble beregnet i forhold til stoffer i samme konsentrasjon løst direkte i mobilfase A.

SLE

Plasma (100 µl) ble sentrifugert før det ble blandet med ammoniumhydroksid i et forhold på 1:1 for å få en pH på 10,7. Prøvene ble tilsatt enten 2 ng/ml eller 20 ng/ml av midazolam og metabolittene. Blandingen av plasma, midazolam, metabolitter og ammoniumhydroksid ble påsatt kolonnen (Chromabond XTR, 1 ml, 250 mg, Macherey-Nagel, Tyskland) og 2 x 500 µl etylacetat ble brukt som elueringsmiddel. Etylacetat ble deretter dampet av med N₂-gass, og prøvene ble reløst i 100 µl mobilfase A. Utbyttet ble beregnet i forhold til ekstraherte plasmaprøver som ble tilsatt analyttene etter ekstraksjonen.

SPE

Plasma (200 µl) ble sentrifugert og pH-justert (pH = 10,7) med ammoniumhydroksid i et forhold på 1:1. Plasma ble deretter tilsatt enten 10 eller 20 ng/ml av midazolam og metabolittene. Omvendt fase-kolonnene (Oasis HLB 1cc (30 mg), Waters, Milford, USA) ble kondisjonert med 1 ml metanol og deretter vasket med 1 ml metanol i vann (10:90 % v/v). Blandingen av plasma, midazolam, metabolitter og ammoniumhydroksid ble påsatt kolonnen og 2 x 200 µl metanol:vann (90:10 % v/v) ble brukt som elueringsmiddel. Elueringsmiddelet ble dampet av med N₂-gass og prøvene ble reløst i 100 µl mobilfase A. Utbyttet ble beregnet i forhold til ekstraherte plasmaprøver som ble «spiket» med midazolam og metabolitter etter ekstraksjonen.

Prøvene ble analysert som beskrevet i 2.2.3. Prosentvist utbytte og relativt standardavvik ble sammenlignet for de tre metodene ved konsentrasjonen 20 ng/ml av midazolam og metabolitter.

Tabell 3: Oversikt over betingelser for prøveopparbeidelse med væske-væske ekstraksjon (LLE), supported væske-ekstraksjon (SLE) og fast fase-ekstraksjon (SPE). MeOH: metanol.

	LLE (n = 4)	SLE (n = 3)	SPE (n = 3)
pH-justering	Ammoniakk	Ammoniumhydroksid	Ammoniumhydroksid
pH i prøven etter justering	10,1	10,7	10,7
Plasmavolum	100 µl	100 µl	200 µl
Kondisjonering	-	-	1000 µl MeOH
Vask	-	-	2 x 1000 µl MeOH:H ₂ O (10:90 v/v)
Elueringsmiddel	3 x 100 µl etylacetat (99,7 %)	2 x 500 µl etylacetat (99,7 %)	2 x 200 µl MeOH:H ₂ O (90:10 v/v)
Reløst i volum mobilfase A	50 µl	100 µl	100 µl

2.3 Validering

Til valideringen ble det brukt legemiddelfritt plasma av blod fra ett individ. Blodprøvene ble tappet i EDTA-rør og sentrifugert ved 1800 G i 10 minutter. Det legemiddelfrie plasmaet ble etter sentrifugering overført til eppendorfrør og oppbevart ved -20 °C. All validering ble utført med SLE som prøveopparbeidelsesmetode. I alle sekvensene ble det analysert kvalitetskontrollprøver (QC-prøver) med konsentrasjoner 5 ng/ml og 100 ng/ml midazolam, metabolitter og intern standard løst direkte i 100 µl mobilfase A. QC-prøvene ble analysert ved 3 injeksjoner fra samme rør før og etter plasmaprøvene. Tilfredsstillende avvik i topphøydesignal for QC-prøvene ble satt til <20 %. Ved et høyere avvik ble det vurdert om forsøket burde reanalyseres.

2.3.1 Utbytte

Utbytte ved SLE ble undersøkt ved å «spike» plasma (sentrifugert 5 min, 700 G) med to konsentrasjoner midazolam, metabolitter og intern standard, henholdsvis 5 ng/ml og 100 ng/ml. Metanol ble dampet av med N₂-gass før plasma ble tilsatt. For hver av konsentrasjonene ble en stor prøve med 500 µl plasma «spiket» og blandet godt med whirlmikser og deretter fordelt på 4 rør à 100 µl. Til de 4 rørene ble det tilsatt 100 µl ammoniumhydroksid for å få en pH på 10,7. SLE ble utført som beskrevet i 2.2.4. Utbyttet ble beregnet i forhold til ekstraherte plasmaprøver som ble «spiket» med analyttene etter ekstraksjonen. Alle prøvene ble reløst i 100 µl mobilfase A før analyse. QC-prøver ble analysert før og etter prøvesekvensen som beskrevet i 2.3. Carry-over ble undersøkt ved å studere kromatogrammer fra blanke prøver analysert etter prøver med høyest konsentrasjon (100 ng/ml, n = 3).

2.3.2 Linearitet

Det ble laget en standardkurve for å undersøke om det var en lineær sammenheng mellom konsentrasjon og topphøydeforhold av analytt og intern standard. Til standardkurven ble plasmaprøver «spiket» med 7 ulike konsentrasjoner av midazolam og metabolittene; henholdsvis 1, 2, 5, 10, 20, 50 og 100 ng/ml med 2 paralleller av hver konsentrasjon. Alle prøvene ble tilsatt intern standard i en konsentrasjon på 20 ng/ml. For hver konsentrasjon ble 300 µl plasma sentrifugert, «spiket», blandet godt med whirlmikser og deretter fordelt på 2 rør à 100 µl. Metanol ble dampet av med N₂-gass før plasma ble tilsatt. SLE ble utført som

beskrevet i avsnitt 2.2.4. Prøvene ble oppbevart ved -20 °C til de ble analysert. Før analyse ble prøvene reløst i 100 µl mobilfase A. Det ble gjort lineær kurvetilpasning og R^2 -verdier ble beregnet. Langs x-aksen ble det lagt inn verdier av teoretisk mengde stoff som ble injisert fra 10 µl av prøvene (pg OC). Standardkurvene ble analysert både før og etter prøvesekvensen. QC-prøver ble analysert før og etter prøvesekvens som beskrevet i 2.3.

Det ble beregnet nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ) og nedre deteksjonsgrense (LLOD) i parallellene med lavest stoffkonsentrasjon. LLOQ er laveste mengde analytt som kan bestemmes med akseptabel presisjon [58]. LLOQ ble bestemt ved å relatere topphøydesignalet (S) til stoffet med høyden til støy i prøven (N). For å kunne kvantifisere stoffet skal S/N-forholdet være på > 10 . LLOD er laveste mengde analytt som kan detekteres i prøven og S/N-forholdet skal være > 3 . LLOD ble beregnet med ligningen: $LLOD = LLOQ / 3$.

2.3.3 Intra- og interdag-presisjon og nøyaktighet

Metodens repeterbarhet (intradag) og reproducerbarhet (interdag) ble testet. Det ble laget 5 paralleller i intradag-analysen av analyttene i konsentrasjoner på 2, 10 og 100 ng/ml (20, 100 og 1000 pg OC). Interdag-analysen ble gjort med de samme konsentrasjonene i 3 paralleller. Interdag-analysen ble utført fire ganger og data fra intradag-analysen inngår som den femte interdagen. Intern standard ble tilsatt i konsentrasjonen 20 ng/ml. Prøvene ble opparbeidet som beskrevet i 2.3.1 og analysert som beskrevet i 2.2.3. QC-prøver ble analysert før og etter prøvesekvens som beskrevet i 2.3. Verdiene i Tabell 7 er mengde stoff som ble injisert på kolonnen fra 10 µl av prøvene (pg OC).

2.3.4 Stabilitet av midazolam og metabolitter i mobilfase A

Det ble analysert prøver med konsentrasjon på 2, 10 og 100 ng/ml for å undersøke stabilitet av prøver oppbevart ved -20 °C i 72 timer. Plasma ble «spiket» som beskrevet i 2.3.1 og alle prøvene var reløst i mobilfase A etter ekstraksjon. Gjennomsnittet av topphøydeforholdet fra prøver oppbevart ved -20 °C ($n = 2$) ble sammenlignet med gjennomsnittet av topphøydeforholdet til ferske ekstraherte prøver ($n = 3$) med lik konsentrasjon av midazolam og metabolitter. QC-prøver ble analysert før og etter prøvesekvens som beskrevet i 2.3.

QC-prøver ble analysert før og etter en sekvens på 38 timer. Prøvene ble injisert fra samme glass og var derfor sammenlignbare. Topphøydeforholdene ble beregnet ved å dividere stoffets topphøyde med topphøyden til intern standard i samme prøve.

2.3.5 Pasientprøve

Det ble analysert plasmaprøver fra en pasient i cocktailstudien. Denne kliniske studien er godkjent av Regional komitè for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk (Ref.nr: 2013/2379). På bakgrunn av sen oppstart av studien var det av tidsmessige årsaker kun mulig å få analysert plasmaprøver fra én pasient (pasient nummer 51). Pasienten var i diettgruppen og prøvene var baselineprøver tatt fra PK-dag 1 (avsnitt 1.3). Totalt ble 18 plasmaprøver analysert. Blodprøvene ble tatt ved tidspunktene 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 4.25, 4.5, 5, 5.5, 6, 8, 10, 12, 23 og 24 timer etter peroral dose ble administrert. Prøve ved tidspunkt 0 og 4 timer ble tatt like før henholdsvis peroral og intravenøs dose ble administrert. Prøvene ble tatt ved sentralsykehuset i Vestfold, og oppbevart ved -80 °C.

Intern standard (30 µl av 100 ng/ml) ble overført til et eppendorfrør og metanol ble dampet vekk med N₂-gass. Deretter ble 150 µl av plasmaprøven tilsatt tørrstoffet. Av plasmaprøven ble 100 µl prøveopparbeidet ved hjelp av SLE, reløst og analysert som beskrevet i 2.2.3 og 2.3.1. Det ble analysert én standardkurve før og én etter analyse av pasientprøvene. Analysen av standardkurvene ble dessverre ikke som forventet og konsentrasjoner av midazolam ble beregnet med standardkurve fra 3.2.2. Prøver tatt ved tid: 4, 8, 10, 12, 23 og 24 ble analysert uten intern standard. I disse prøvene ble gjennomsnittet av topphøyden til intern standard i de tolv andre prøvene benyttet til beregning av topphøydeforhold. Lineær regresjon av topphøydeforhold mellom midazolam og intern standard som funksjon av analyttkonsentrasjon, genererte ligning med stigningstall og skjæringspunkt. Ligningen ble brukt til beregning av ukjent analyttkonsentrasjon. En farmakokinetisk populasjonsmodell for midazolam utviklet i programvaren Pmetrics (Laboratory of Applied Pharmacokinetics, Los Angeles, CA, USA) ble brukt til å estimere absolutt biotilgjengelighet av midazolam.

3 RESULTATER

3.1 Metodeutvikling

3.1.1 LC-MS/MS-betingelser

Deteksjon

Masseoverganger som ble detektert ved SRM er beskrevet i Tabell 4. De detekterte fragmentationene var ionene som forekom i størst grad ved «tuning».

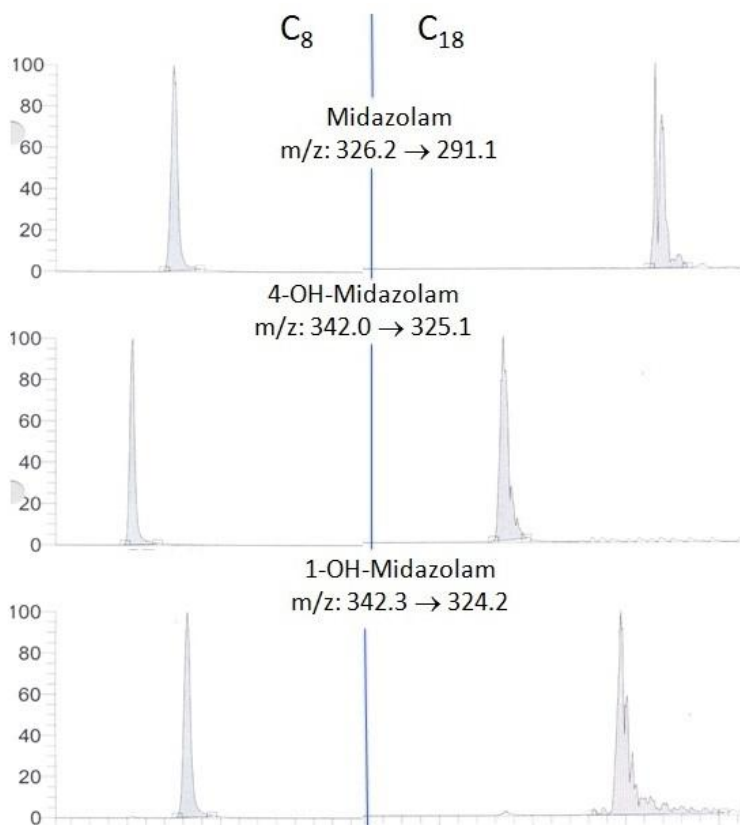
Tabell 4: Masseoverganger og kollisjonsenergi ved MS/MS-deteksjon av midazolam og metabolitter.

	Midazolam	Intern standard	4-OH-midazolam	1-OH-midazolam
Forløperion (<i>m/z</i>)	326,2	332,2	342,0	342,3
Fragmention (<i>m/z</i>)	291,1	297,2	325,1	324,2
Kollisjonsenergi (AU)	26	28	24	30

Kromatografi

Relativt standardavvik for areal og topphøyde var henholdsvis 2,7 og 2,5 % for midazolam, 5,8 og 4,5 % for 4-OH-midazolam og 2,8 og 3,1 % for 1-OH-midazolam. Det ble valgt å benytte topphøyde i de videre analysene på grunn av marginalt mindre relativt standardavvik.

C₈-kolonnen ga kortere retensjonstider og smalere topper enn det C₁₈-kolonnen gjorde (Figur 9). Retensjonstider for C₈- og C₁₈-kolonne var henholdsvis 6 og 20 minutter for midazolam, 4 og 11 minutter for 4-OH-midazolam og 7 og 18 minutter for 1-OH-midazolam. De endelige retensjonstidene til analyttene ved bruk av C₈-kolonne ble som følger: midazolam: 13,9 minutter, 4-OH-midazolam: 9,6 minutter, 1-OH-midazolam: 14,7 minutter og intern standard: 13,7 minutter. Rekkefølgen av analyttene ble endret ved bruk av C₈-kolonnen. Midazolam ble retardert mest ved bruk av C₁₈-kolonnen, mens 1-OH-midazolam ble retardert mest med C₈-kolonne.



Figur 9: Sammenligning mellom C₈- og C₁₈-kolonne. Begge analysene ble gjort uten forkolonne.

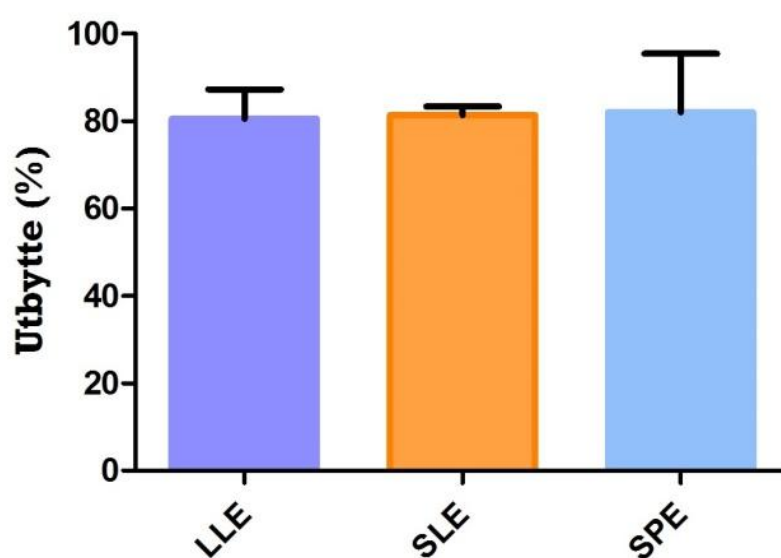
Endret sammensetning av mobilfase A fra ammoniumformiat til ammoniumacetat ga ingen forskjeller i retensjonstid, fasong eller bredde på toppene. Ammoniumacetat ble brukt videre på grunn av teoretisk bedre bufferkapasitet.

3.1.2 Sammenligning av ulike prøveopparbeidelsesmetoder

De tre prøveopparbeidelsesmetodene ga tilfredsstillende utbytte av midazolam og metabolittene (Tabell 5). Det var ingen forskjeller i utbytte av midazolam ved LLE ($81\% \pm 7\%$), SLE ($81\% \pm 2\%$) og SPE ($82\% \pm 11\%$) (Figur 10, Tabell 5). Metabolittene hadde noe større utbytte ved SPE enn SLE, men det var vesentlig høyere standardavvik (Tabell 5). Av de tre analyttene hadde metabolitten 4-OH-midazolam størst standardavvik ved alle prøveopparbeidelsesmetodene. SLE ble benyttet i det videre arbeidet på grunn av lav variasjon og at metoden er raskest å utføre. LLE ble tidlig utelukket grunnet vanskeligheter med å skille de to fasene.

Tabell 5: Prosentvis utbytte av midazolam, 4-OH-midazolam og 1-OH-midazolam ved de tre prøveopparbeidelsesmetodene. Data er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik

	LLE (n = 4)	SLE (n = 3)	SPE (n = 3)
Midazolam	81 \pm 7 %	81 \pm 2 %	82 \pm 11 %
4-OH-midazolam	128 \pm 104 %	58 \pm 3 %	76 \pm 13 %
1-OH-midazolam	92 \pm 24 %	85 \pm 1 %	97 \pm 13 %



Figur 10: Utbytte i prosent av plasmaprøver tilsatt 20 ng/ml midazolam prøveopparbeidet med LLE: væske-væske-kromatografi (n = 4), SLE: supported væske-ekstraksjon (n = 3) og SPE: fast fase-ekstraksjon (n = 3).

3.2 Validering

3.2.1 Utbytteforsøk

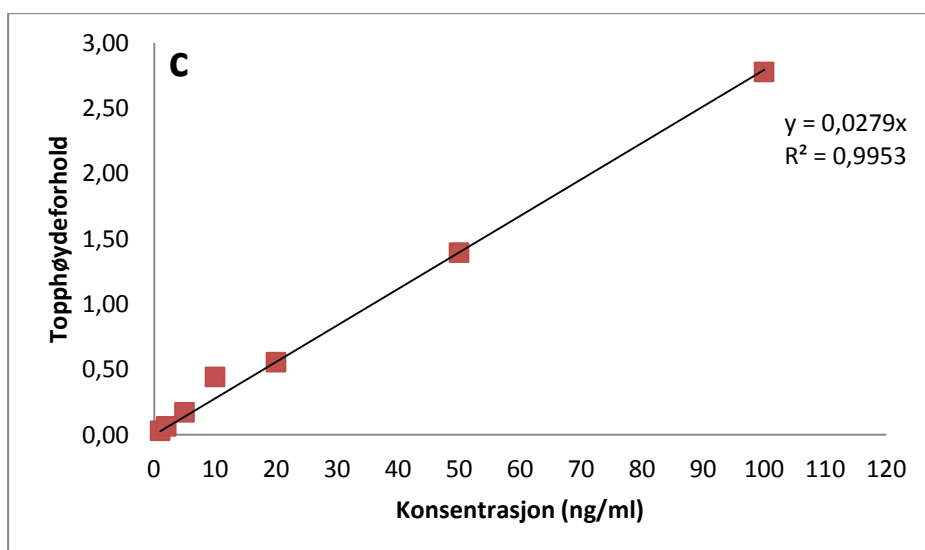
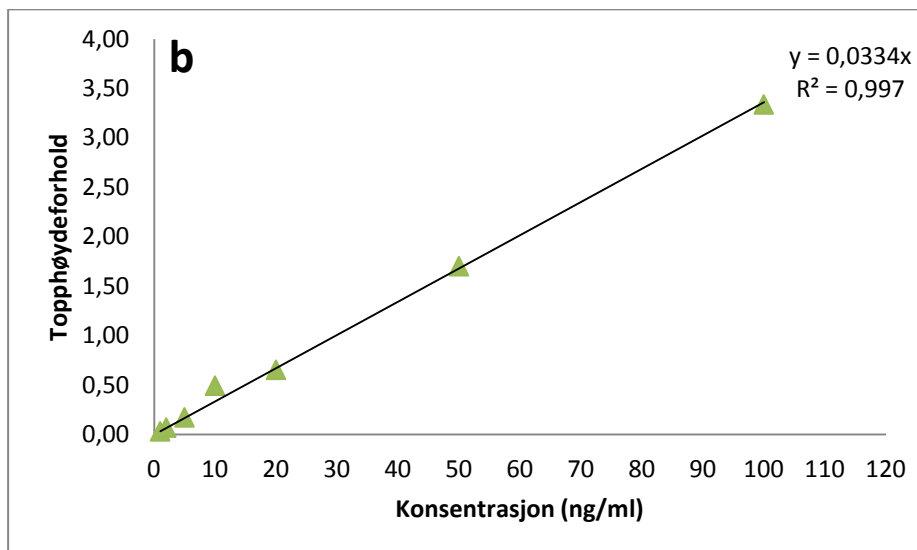
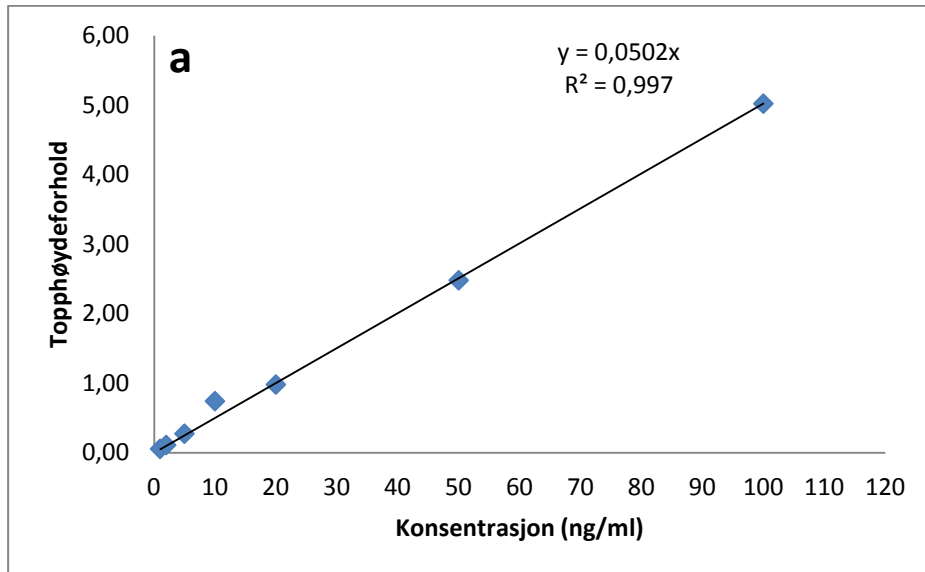
Utbyttet av midazolam og metabolitter var ca 80% ved 5 ng/ml og ca 65% ved 100 ng/ml (Tabell 6). Relativt standardavvik var < 15% for alle analyttene ved begge konsentrasjoner unntatt 100 ng/ml for 1-OH-midazolam (Tabell 6). Intern standard ga det laveste utbyttet med henholdsvis 71 ± 6 % og 56 ± 8 % for 5 ng/ml og 100 ng/ml. Alle tre blankprøvene som ble analysert hadde «carry-over» under 0,3 %.

Tabell 6: Utbytte i prosent ved konsentrasjonene 5 ng/ml og 100 ng/ml. Data er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik. RSD: relativt standardavvik.

	5 ng/ml			100 ng/ml		
	% utbytte	n	RSD	% utbytte	n	RSD
Midazolam	78 \pm 8	3	5 %	62 \pm 2	4	13 %
Intern standard	71 \pm 1	3	8 %	56 \pm 6	4	14 %
4-OH-midazolam	81 \pm 1	3	2 %	68 \pm 8	4	4 %
1-OH-midazolam	77 \pm 7	2	4 %	62 \pm 2	4	23 %

3.2.2 Linearitet

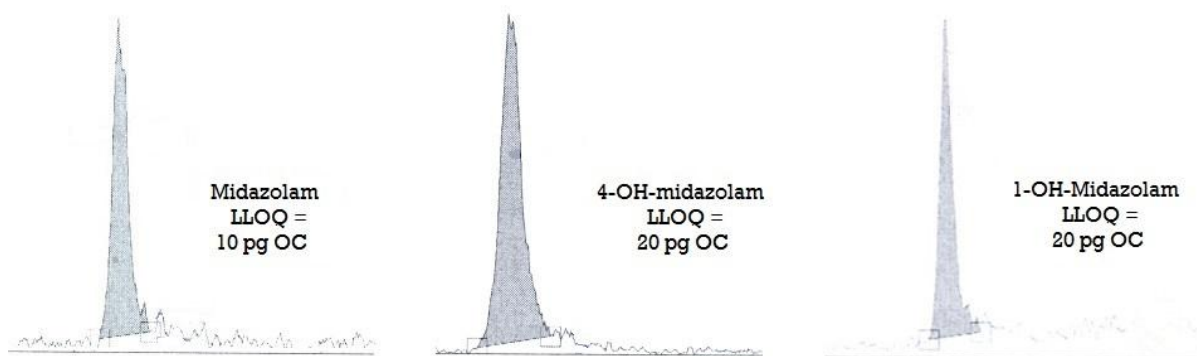
For å undersøke lineariteten til midazolam og metabolittene ble det laget prøver med syv ulike konsentrasjoner. Det ble laget to paralleller per konsentrasjon. Data for midazolam, 1-OH-midazolam og 4-OH-midazolam ble tilpasset lineære standardkurver (Figur 11).



Figur 11: Standardkurver for: a) Midazolam, b) 1-OH-midazolam, c) 4-OH-midazolam, med tilhørende ligning og korrelasjonskoeffisient.

Standardkurvene viste lineær sammenheng mellom konsentrasjon og topphøydeforhold med korrelasjonskoeffisienter (R^2) > 0,995 for både midazolam og de to metabolittene. Standardkurven til midazolam og 1-OH-midazolam ble laget ved å beregne gjennomsnittlig topphøydeforhold av analytt og intern standard av de to parallellene både før og etter analysesekvensen. For 4-OH-midazolam ble standardkurven derimot laget ved å bruke gjennomsnittlig topphøydeforhold av analytt og intern standard kun i prøvene før analysesekvensen. Prøvene for 4-OH-midazolam som ble analysert etter valideringssekvensen ble ikke brukt på grunn av mulig nedbrytning av analytten.

Ved de laveste konsentrasjonene ($n = 2$) ble det undersøkt S/N-forhold for å beregne LLOQ for de ulike analyttene (Figur 12). LLOQ for midazolam var 10 pg OC, mens metabolittene hadde en LLOQ på 20 pg OC. LLOD for midazolam og metabolitter ble beregnet til henholdsvis 3,4 pg OC og 6,7 pg OC.



Figur 12: Nedre kvantifiseringsgrense (LLOQ) for midazolam og metabolittene.

3.2.3 Presisjon og nøyaktighet

Resultatene fra valideringen viste god presisjon og nøyaktighet for midazolam med avvik < 15 % fra sann verdi. Intradag variasjon for midazolam varierte mellom 0,8 til 2,3 % avvik i presisjon og mellom -5,2 til 13,3 % avvik i nøyaktighet, mens interdagvariasjonen varierte mellom 2,2 til 8,3 % avvik i presisjon og mellom 3,5 til 6,8 % avvik i nøyaktighet (Tabell 7). For hovedmetabolitten, 1-OH-midazolam, var det også tilfredsstillende med en intra- og interdagvariasjon mellom 3,7 til 9,7 % avvik for presisjon og -2,4 til 17,8 % avvik for nøyaktighet. Kun en av verdiene for nøyaktighet falt utenfor grensen på < 15 % (Tabell 7). Valideringsdataene for 4-OH-midazolam viste imidlertid noe dårligere presisjon og nøyaktighet. Intradag-dataene viste god presisjon (2,0 til 4,2 % avvik), mens interdag-nøyaktighet ikke var tilfredsstillende (24,5 til 27,4 % avvik) (Tabell 7).

Tabell 7: Intra- og interdagvariasjon. Presisjons- og nøyaktighetsdata presenteres som % avvik fra sann verdi. Målt mengde er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik.

Intradag (n = 5)	Teoretisk mengde (pg)	Målt mengde (pg)	Presisjon (%)	Nøyaktighet (%)
Midazolam	20	21,0 \pm 0,2	0,8	-5,2
	100	87 \pm 2	2,3	13,3
	1000	912 \pm 13	1,4	8,8
4-OH-midazolam*	20	20,4 \pm 0,4	2,2	-2,2
	100	81 \pm 2	2,0	19,5
	1000	860 \pm 36	4,2	14,0
1-OH-midazolam	20	20,0 \pm 1,2	6,3	0,1
	100	82 \pm 3	3,7	17,8
	1000	1024 \pm 59	5,7	-2,4
Interdag (n = 5)				
Midazolam	20	19,2 \pm 1,6	8,1	4,1
	100	97 \pm 8,0	8,3	3,5
	1000	932 \pm 21	2,2	6,8
4-OH-midazolam*	20	14,8 \pm 3,5	24,0	26,1
	100	76 \pm 8	10,3	24,5
	1000	726 \pm 101	13,9	27,4
1-OH-midazolam	20	17,4 \pm 1,7	9,7	13,0
	100	91 \pm 7	8,0	9,4
	1000	977 \pm 47	4,8	2,3

*Mengder beregnet med standardkurven som bare inneholdt topphøydeforhold i de to før-parallellene. 20 pg OC tilsvarer 2 ng/ml på grunn av injeksjonsvolum på 10 μ l.

3.2.4 Stabilitet av midazolam og metabolitter i mobilfase A

For å se om prøvene tålte å bli fryst ned i mobilfase A etter ekstraksjon, ble alle de reløste prøvene (n = 2) oppbevart i fryser i 72 timer. Deretter ble prøvene analysert i samme sekvens som ferske ekstraherte prøver reløst i mobilfase A. Topphøydene ble sammenlignet med topphøydene til de ferske prøvene med samme konsentrasjon av midazolam, metabolitter og intern standard. Midazolam og 1-OH-midazolam oppfylte kravet til European Medicines Agency (EMA) [66] om < 15 % avvik fra sann konsentrasjon ved alle de tre konsentrasjonene (Tabell 8). Intern standard oppfylte ikke kravet ved den midterste konsentrasjonen, mens metabolitten 4-OH-midazolam hadde høyere avvik (21 til 26 %) ved alle de tre konsentrasjonene.

Tabell 8: Gjennomsnittlig topphøyde av nedfryste prøver (n = 2) dividert med gjennomsnittlig topphøyde av ferske prøver (n = 3).

	2 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml
Midazolam	102 %	91 %	93 %
Intern standard	87 %	81 %	88 %
4-OH-midazolam	75 %	79 %	74 %
1-OH-midazolam	101 %	88 %	91 %

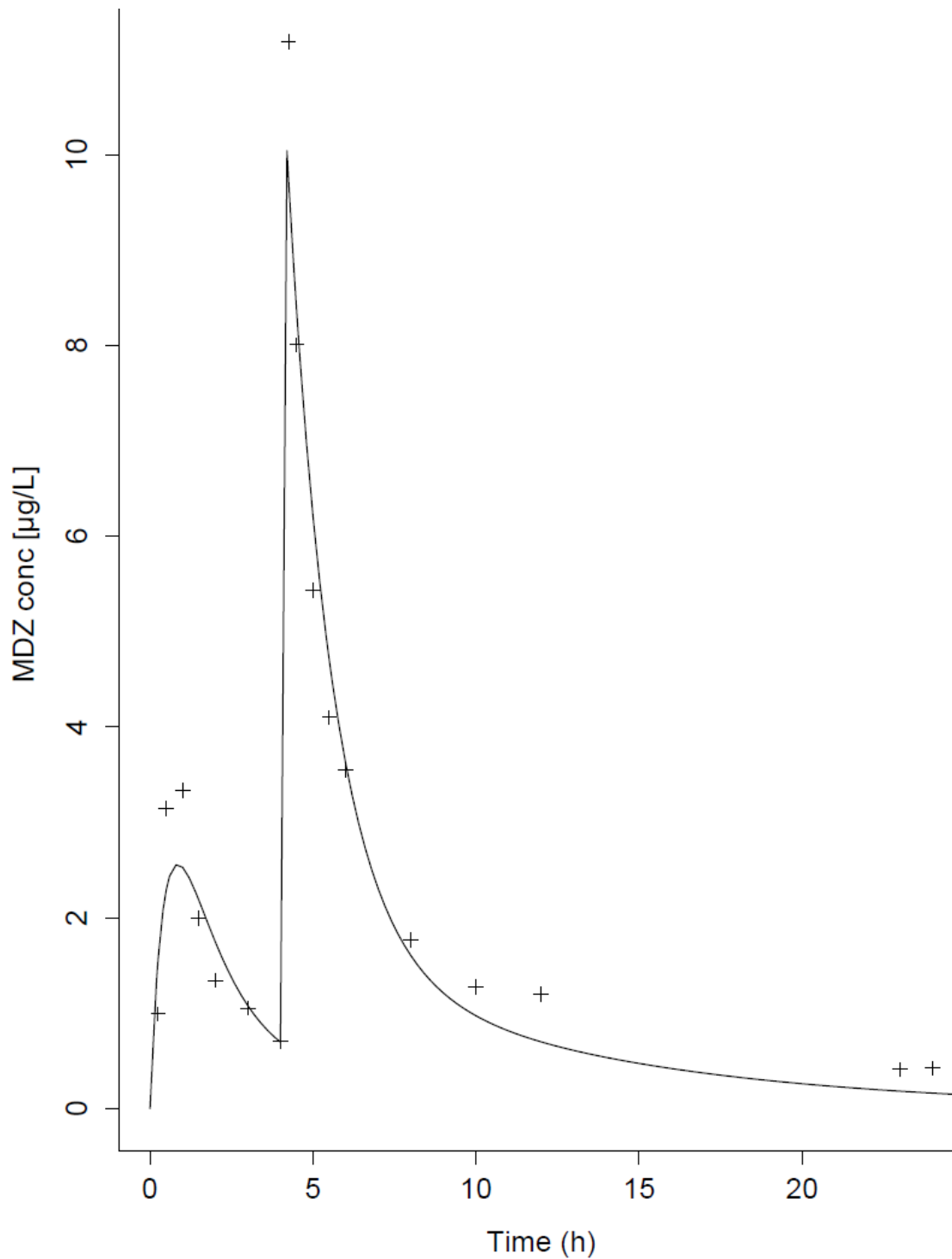
På grunn av fremtidige lange analysesekvenser av plasmaprøver med innhold av midazolam og metabolitter, var det viktig å fastslå stabiliteten av prøvene ved oppbevaring i autoinjektor (4 °C). Forsøket viste at midazolam og 1-OH-midazolam holdt seg stabile i løpet av en total analysesekvens på 38 timer (Tabell 9). Topphøydeforhold av 4-OH-midazolam etter sekvensen var imidlertid 45 % av forholdet før sekvensen. Dette kan tyde på nedbrytning av 4-OH-midazolam løst i mobilfase A ved oppbevaring i autoinjektoren.

Tabell 9: Topphøyden av analyttene dividert med topphøyden til intern standard i QC-prøver. Prøvene er analysert før og etter en sekvens på 38 timer.

	Midazolam		4-OH-midazolam		1-OH-midazolam	
	Før	Etter	Før	Etter	Før	Etter
Parallell 1	24,4 %	23,3 %	13,5 %	5,7 %	14,3 %	15,7 %
Parallell 2	23,7 %	23,9 %	14,3 %	6,4 %	15,3 %	15,6 %
Parallell 3	22,8 %	24,5 %	13,6 %	6,6 %	13,4 %	15,5 %
Gjennomsnitt	23,6 %	23,9 %	13,8 %	6,2 %	14,3 %	15,6 %

3.2.5 Pasientprøve

Totalt 18 plasmaprøver fra én av pasientene i diettgruppen i cocktailstudien ble analysert. Midazolam ble kvantifisert i 16 av de 18 plasmaprøvene, men metabolittene kunne ikke kvantifiseres i noen av prøvene. Figur 13 viser plasmakonsentrasjonene av midazolam som funksjon av tid for pasient nr 51. Ved hjelp av den farmakokinetiske populasjonsmodellen for midazolam ble absolutt biotilgjengelighet beregnet til å være 28 % for denne pasienten.



Figur 13: Plasmakonsentrasjon av midazolam som funksjon av tid for pasient 51 i cocktailstudien. Kurven er estimert ved hjelp av den farmakokinetiske populasjonsmodellen for midazolam. Kryssene i figuren er de faktiske plasmakonsentrasjonene fra pasienten, mens den heltrukne linjen er populasjonsmodellens predikering av plasmakonsentrasjonene til pasienten..

4 DISKUSJON

Det er i denne oppgaven blitt utviklet en sensitiv LC-MS/MS-metode for å kvantifisere midazolam i plasma fra sykelig overvektige pasienter. Metoden har blitt validert, og resultatene viste en god linearitet, presisjon og nøyaktighet for midazolam og hovedmetabolitten 1-OH-midazolam. LLOQ for midazolam ble estimert til 10 pg OC. Sammenlignet med LC-MS-metoden det ble tatt utgangspunkt i er LLOQ for metabolittene redusert fra 500 pg OC til 20 pg OC [64]. Dette er med andre ord 25 ganger høyere sensitivitet enn den opprinnelige metoden. I tillegg har prøver fra én pasient i cocktailstudien blitt kvantifisert ved den validerte metoden, og plasmakonsentrasjonene av midazolam over tid etter peroral og intravenøs administrasjon av midazolam ga en absolutt biotilgjengelighet på 28 % i denne pasienten.

Som det fremgår av valideringen, ga metoden en tilfredsstillende presisjon for midazolam med avvik på 0,8 til 2,3 % og 2,2 til 8,3 % fra sann konsentrasjon ved henholdsvis intra- og interdagvariasjon. Nøyaktigheten avvek fra sann konsentrasjon mellom -5,2 til 13,3 % og 3,5 til 6,8 % for intra- og interdagvariasjon. Følgelig tilfredsstilte metoden den anbefalte grensen for avvik fra sann konsentrasjon fastsatt av EMA (<15 %) [66]. Videre viste også analysen av 1-OH-midazolam god presisjon og nøyaktighet for intra- og interdagvariasjon i de fleste konsentrasjonene som ble testet, selv om nøyaktighetsavviket var litt over grensen ved én av de testede konsentrasjonene. Intradagdataene for 4-OH-midazolam viste en god presisjon, men dårligere nøyaktighetsdata ved interdagsanalysen hvor alle konsentrasjonene var utenfor det anbefalte avviket. Stabilitetsforsøkene av av de ulike substansene viste imidlertid en mulig nedbrytning av 4-OH-midazolam etter reløsning i mobilfase A. Siden 4-OH-midazolam har blitt beskrevet å være ustabil ved sur pH i litteraturen [45, 67-69], kan dette være med på å forklare det reduserte topphøydeforholdet til 4-OH-midazolam over tid som ble observert i denne oppgaven. Etter frysing og tining av prøver, oppfylte midazolam og 1-OH-midazolam kravet om < 15 % avvik satt av EMA ved alle tre konsentrasjonene [66].

Deteksjon av midazolam og metabolitter i den nyutviklede metoden ble utført med ESI i positiv mode som ioniseringskilde, lineær ionefelle som masseanalysator og tandem-MS-detektor som detektor. Metoden det ble tatt utgangspunkt i analyserte kun midazolams metabolitter. Denne metoden brukte ESI i positiv mode som ioniseringskilde, en enkel kvadrupol som masseanalysator og enkel MS som detektor. Separering av stoffene med

kromatografi var nødvendig i begge analysene fordi metabolittene har samme m/z . Fragmentationene til midazolam og 4-OH-midazolam som ble anvendt i denne oppgaven har blitt beskrevet i en tidligere studie [68], mens fragmentationet for 1-OH-midazolam avviker fra studier som sier at ionet har en m/z -verdi på 203,0-203,2 m/z [68, 70]. I denne oppgaven hadde 203,0 m/z en forekomst på rundt 2 % ved «tuning» av 1-OH-midazolam, og ionet ble følgelig ikke brukt som fragmentation.

C₈-kolonne ble valgt for separasjon av analyttene og total analysetid var på 25 minutter. Retensjonstidene ble endret fra de innledende forsøkene til den endelige metoden. Endringene i retensjonstid (for eksempel fra 4 til 9,6 minutter for 4-OH-midazolam) fra innledende forsøk til den endelige metoden, kom av en slakere bratthet av mobilfase B i gradientelueringen. Midazolam hadde en retensjonstid på 20 minutter ved bruk av C₁₈-kolonnen. Toppen kom med det senere enn den raskt økte andelen mobilfase B i programmet. Den raskt økte andelen er en del av kolonnevasken for å bli kvitt organiske urenheter etter at analyttene har blitt transportert gjennom kolonnen. At midazolams retensjonstid var lenger enn dette kunne ødelegge muligheten til å kvantifisere analytten. Hovedproblemene var at urenheter med samme m/z kunne bli registrert samtidig, eller at det kunne bli flere topper med detektering av midazolam. Dette ville ført til gal kvantifisering. Et annet problem var at kolonnen ikke ble vasket tilstrekkelig med 10 kolonnevolumer med mobilfase før neste prøve ble analysert. Retensjonstiden kunne gjøres kortere med å ha en brattere gradient av mobilfase B, men valget falt heller på C₈-kolonnen i den endelige metoden, som til slutt ga en retensjonstid for midazolam på 13,9 minutter.

SLE ble valgt som prøveopparbeidelsesmetode fordi denne metoden ga et godt utbytte, samtidig som at den hadde en lavere variabilitet enn LLE og SPE. I tillegg var metoden tidsbesparende i forhold til SPE siden det ikke var behov for kondisjonering og vask av kolonnematerialet før prøven ble påsatt. I SPE-prosedyren i dette arbeidet inneholdt elueringsmidlet metanol:vann (90:10 v/v). Siden vann er en lite flyktig komponent tok det derfor lang tid før elueringsmiddelet ble dampet av med N₂-gass. Tidsbesparelsen som oppnås ved å benytte SLE er en klar fordel med tanke på det store prøvevolumet som cocktailstudien vil generere med over 6000 plasmaprøver som skal analyseres. Økonomisk sett var SLE- og SPE-metodene like dyre. LLE som prøveopparbeidelsesmetode ble valgt bort relativt tidlig på grunn av vanskeligheter med å skille de to fasene fra hverandre. Ved risting ble det dannet skum som vanskeliggjorde skilling av fasene ytterligere. I tillegg er det større risiko for

emulgering av de to fasene ved LLE kontra SLE [55, 57]. LLE ga like høyt utbytte som de andre metodene, men denne viste også høyere variabilitet enn SLE og SPE. Komponenter i plasma kan være med på å forsterke signalet til analyttene i analysen. Derfor er det viktig å gjøre forsøk på hvor mye matriksen bidrar til signalenes topphøyde. Det ble ikke gjort noen forsøk på matrikseffekter i dette arbeidet, men dette skal gjøres ved et senere tidspunkt. I referanseprøvene til LLE-forsøket var stoffene løst direkte i mobilfase A. I SLE- og SPE-forsøkene var referanseprøvene plasma som ble ekstrahert før tilsetning av analyttene. Når prøvene og referanseprøvene ble prøveopparbeidet på samme måte ga det et bedre grunnlag for sammenligning. LLE-prøvene hadde i noen tilfeller utbytte $> 100 \%$, noe som kan tyde på at eventuelle urenheter i plasmaprøvene har gitt en signalforsterkning i detektoren. Et forsøk med referanseprøver bestående av ekstrahert plasma før tilsetning av stoffer (som utført ved SLE og SPE) burde ideelt sett blitt gjort for en best mulig sammenligning av prøveopparbeidelsesmetodene. Dette ville utjevnet eventuelle forskjeller mellom metodene knyttet til signalforsterkning. I alle tre prøveopparbeidelsesmetodene ble plasma pH-justert til over 10 for å unngå at azepinringen i molekylene skulle åpnes ved fysiologisk pH [71]. Dette ville ført til at molekylet var dårlig løselig i organisk fase, noe som kunne gitt et dårlig ekstraksjonsutbytte.

Konsentrasjonsområdet for standardkurvene ble bestemt ut ifra innledende forsøk og søk i litteraturen. I en studie utført i 2014 [65] ble det gitt enkeltdoser på 7,5 mg midazolam peroralt og 5 mg intravenøst til sykkelig overvektige pasienter. Dette er en dose som er fem ganger så høy som cocktailstudien dosering. De observerte midazolamkonsentrasjonene var hyppigst mellom 2 til 100 ng/ml [65]. Plasmakonsentrasjon av metabolittene ble ikke undersøkt i denne studien [65]. Siden LLOQ i den utviklede metoden i denne oppgaven var i nærheten av 1 til 2 ng/ml, ble det besluttet å lage en standardkurve i intervallet 1 til 100 ng/ml. Standardkurvene for midazolam og de to metabolittene viste linearitet i hele konsentrasjonsområdet ($R^2 > 0,995$).

Plasmaprøver fra en pasient i cocktailstudien ble analysert ved den utviklede LC-MS/MS metoden. Prøver tatt ved forskjellige tidspunkt etter midazolam-administrering (peroral og intravenøs) ga kvantifiserbare mengder av midazolam. To av prøvene ga ikke kvantifiserbare mengder av midazolam. Disse prøvene var imidlertid tatt 19 og 20 timer etter intravenøs administrering, og siden litteraturen oppgir en $t_{1/2}$ for midazolam på 1,5-3,5 timer [47, 48] var det derfor ikke forventet å finne kvantifiserbar mengde av midazolam i disse prøvene.

Resultatene fra analysen av midazolam ga en absolutt biotilgjengelighet for legemidlet på 28 % i denne pasienten. Dette indikerer at den utviklede metoden kan anvendes videre til å bestemme absolutt biotilgjengelighet av midazolam i cocktailstudien, både i pasienter som tar tarmreduserende kirurgi og i diettkontrollerte pasienter. Det bør imidlertid presiseres at det ikke er mulig å fastslå om metodens kvantifiseringsgrense er god nok ennå, da det kun er undersøkt plasmaprøver i én pasient.

Metabolittene lot seg ikke kvantifisere i pasientprøvene i denne oppgaven, og en videre optimalisering av metoden er sannsynligvis nødvendig. En mulig årsak til lave signaler for metabolittene kunne være at pasienten hadde en lav CYP3A-aktivitet. Dette er lite sannsynlig siden midazolam ikke ble detektert i store mengder. Mer trolig er det at ytterligere optimalisering av metoden er nødvendig for å kunne oppnå lavere kvantifiseringsgrenser for metabolittene. Mulige endringer i metoden for å oppnå kvantifiserbare topper av metabolittene involverer å øke plasmamengden som ekstraheres, oppkonsentrering av prøvene eller å øke injeksjonsvolumet som injiseres på LC-kolonnen.

I litteraturen er det observert både økt og redusert biotilgjengelighet ved administrering av CYP3A-substrater til pasienter som har gjennomgått bariatrisk kirurgi. En mulig mekanisme for lavere AUC etter bariatrisk kirurgi er at områder med stort absorpsjonsareal i tarmen forbikobles [38, 40]. Økt AUC kan komme av at den forbikoblede delen av tarmen inneholder mest CYP-enzymmer [20, 37]. Ved forbikobling av områder med høyest andel av tarmens CYP3A-innhold [20], vil det kunne være mindre effektiv metabolisme av substratene etter inngrepet. Etter 2 år har det imidlertid blitt sett normalisering av systemisk eksponering av atorvastatin [32]. En årsak til normalisering av CYP3A-substraters biotilgjengelighet kan være at mer aktive deler i tarmen øker overflatearealet som gir en oppregulering av CYP3A i forhold til deler som er blitt forbikoblet [32, 72, 73]. Cocktailstudien vil bidra til å gi økt kompetanse om farmakokinetikk i sykkelig overvektige pasienter, og den utviklede og validerte metoden til analyse av midazolam, som er en anerkjent probe på CYP3A-aktivitet, er således av vesentlig betydning.

5 KONKLUSJON

En sensitiv LC-MS/MS-metode for kvantifisering av midazolam i plasma er utviklet i denne oppgaven. Metoden viste god linearitet, presisjon og nøyaktighet ved analyse av midazolam og 1-OH-midazolam. For 4-OH-midazolam var interdag-nøyaktigheten utenfor anbefalt avvik ved alle analyserte konsentrasjoner.

Ved hjelp av den utviklede metoden ble det analysert plasmaprøver fra en pasient i cocktailstudien, hvor det ble funnet kvantifiserbare mengder av midazolam i alle prøver med forventet innhold av legemidlet. Metabolittene var imidlertid ikke i kvantifiserbare mengder i pasientprøvene, og ytterligere optimalisering er nødvendig for å kunne kvantifisere midazolams metabolitter.

LITTERATURLISTE

1. Lin JH. Pharmacokinetic and pharmacodynamic variability: a daunting challenge in drug therapy. *Curr Drug Metab*. 2007;8(2):109-36.
2. Aarbakke J, Endresen PC. Hvordan er det med reseptorene mine, doktor? *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2001;121(15):1832-3.
3. Buxton I, Benet L. The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination in Goodman & Gilman's *The Pharmacological basis of Therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011.
4. Costa A, Sarmiento B, Seabra V. An evaluation of the latest in vitro tools for drug metabolism studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(1):103-19.
5. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, et al. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2006;34(5):880-6.
6. Rowland M, Tozer TN. *Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
7. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(3):215-36.
8. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008;38(7-8):802-32.
9. Bruyere A, Decleves X, Bouzom F, et al. Effect of variations in the amounts of P-glycoprotein (ABCB1), BCRP (ABCG2) and CYP3A4 along the human small intestine on PBPK models for predicting intestinal first pass. *Mol Pharm*. 2010;7(5):1596-607.
10. Pond S, Tozer T. First-Pass Elimination Basic Concepts and Clinical Consequences. *Clin Pharmacokinet*. 1984;9(1):1-25.
11. Gonzalez F. Drug Metabolism in Goodman & Gilman's *The Pharmacological basis of Therapeutics*. 12th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2011.
12. Hasler J. Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med*. 1999;20(1-2):1-137.
13. Rang H, Dale M. *Rang & Dale's Pharmacology*. 7th ed: Elsevier: Churchill Livingstone; 2012.
14. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;270(1):414-23.
15. Lin JH, Lu AYH. Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet*. 1998;35(5):361-90.
16. Samer CF, Lorenzini KI, Rollason V, et al. Applications of CYP450 Testing in the Clinical Setting. *Mol Diagn Ther*. 2013;17(3):165-84.
17. Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:1-17.
18. Omari AA, Murry DJ. Pharmacogenetics of the Cytochrome P450 Enzyme System: Review of Current Knowledge and Clinical Significance. *J Pharm Pract*. 2007;20(3):206-18.
19. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 2001;27(4):383-91.
20. Paine MF, Khalighi M, Fisher JM, et al. Characterization of Interintestinal and Intraintestinal Variations in Human CYP3A-Dependent Metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283(3):1552-62.
21. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(10):1271-94.

22. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, et al. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J.* 2011;11(4):274-86.
23. Elens L, Nieuweboer A, Clarke SJ, et al. CYP3A4 intron 6 C>T SNP (CYP3A4*22) encodes lower CYP3A4 activity in cancer patients, as measured with probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenomics J.* 2013;14(2):137-49.
24. Glowacki F, Lionet A, Hammelin JP, et al. Influence of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5) genetic polymorphism on the pharmacokinetics of the prolonged-release, once-daily formulation of tacrolimus in stable renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2011;50(7):451-9.
25. Kirwan C, MacPhee I, Philips B. Using drug probes to monitor hepatic drug metabolism in critically ill patients: midazolam, a flawed but useful tool for clinical investigation of CYP3A activity? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2010;6(6):761-71.
26. Ma MK, Woo MH, McLeod HL. Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm.* 2002;59(21):2061-9.
27. Christensen H, Hermann M. Immunological response as a source to variability in drug metabolism and transport. *Front Pharmacol.* 2012;3(8):1-10.
28. Hjeltnes J, Sandbu R. Sykelig overvekt – ulikt behandlingstilbud. *Tidsskr Nor Lægeforen.* 2010;130(18).
29. Midtthjell K, Lee CMY, Langhammer A, et al. Trends in overweight and obesity over 22 years in a large adult population: the HUNT Study, Norway. *Clin Obes.* 2013;3(1-2):12-20.
30. Grundy SM. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(4):295-309.
31. Gu X, Ke S, Liu D, et al. Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents. *J Biol Chem.* 2006;281(26):17882-9.
32. Jakobsen GS, Skottheim IB, Sandbu R, et al. Long-term effects of gastric bypass and duodenal switch on systemic exposure of atorvastatin. *Surg Endosc.* 2013;27(6):2094-101.
33. Ulvestad M, Skottheim IB, Jakobsen GS, et al. Impact of OATP1B1, MDR1, and CYP3A4 Expression in Liver and Intestine on Interpatient Pharmacokinetic Variability of Atorvastatin in Obese Subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;93(3):275-82.
34. Brocks DR, Ben-Eltriki M, Gabr RQ, Padwal RS. The effects of gastric bypass surgery on drug absorption and pharmacokinetics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2012;8(12):1505-19.
35. Hofsø D, Aasheim ET, Søvik TT, et al. Oppfølging etter fedmekirurgi. *Tidsskr Nor Lægeforen.* 2011;131(19):1887-92.
36. Buchwald H. The evolution of metabolic/bariatric surgery. *Obes Surg.* 2014;24(8):1126-35.
37. Skottheim IB, Jakobsen GS, Stormark K, et al. Significant increase in systemic exposure of atorvastatin after biliopancreatic diversion with duodenal switch. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(6):699-705.
38. Roerig JL, Steffen K, Zimmerman C, et al. Preliminary comparison of sertraline levels in postbariatric surgery patients versus matched nonsurgical cohort. *Surg Obes Relat Dis.* 2012;8(1):62-6.
39. Skottheim IB, Stormark K, Christensen H, et al. Significantly altered systemic exposure to atorvastatin acid following gastric bypass surgery in morbidly obese patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(3):311-8.
40. Rogers CC, Alloway RR, Alexander JW, et al. Pharmacokinetics of mycophenolic acid, tacrolimus and sirolimus after gastric bypass surgery in end-stage renal disease and transplant patients: a pilot study. *Clin Transplant.* 2008;22(3):281-91.

41. Diczfalussy U, Nylén H, Elander P, Bertilsson L. 4 β -hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans. *Br J Clin Pharmacol*. 2011;71(2):183-9.
42. Nordt SP, Clark RF. Midazolam: A review of therapeutic uses and toxicity. *J Emerg Med*. 1997;15(3):357-65.
43. Paine MF, Shen DD, Kunze KL, et al. First-pass metabolism of midazolam by the human intestine. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60(1):14-24.
44. Chung E, Nafziger AN, Kazierad DJ, Bertino JS, Jr. Comparison of midazolam and simvastatin as cytochrome P450 3A probes. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;79(4):350-61.
45. Link B, Haschke M, Wenk M, Krahenbuhl S. Determination of midazolam and its hydroxy metabolites in human plasma and oral fluid by liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007;21(9):1531-40.
46. Reves J, Fragen R, Vinik H, Greenblatt D. Midazolam: Pharmacology and Uses. *Anesthesiology*. 1985;62(3):310-24.
47. Fraser AD, Bryan W, Isner AF. Urinary screening for midazolam and its major metabolites with the Abbott ADx and TDx analyzers and the EMIT d.a.u. benzodiazepine assay with confirmation by GC/MS. *J Anal Toxicol*. 1991;15(1):8-12.
48. Rogers JF, Rocci ML, Haughey DB, Bertino JS. An evaluation of the suitability of intravenous midazolam as an in vivo marker for hepatic cytochrome P4503A activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;73(3):153-8.
49. Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, et al. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics J*. 2003;13(10):595-606.
50. Hoch M, Hoever P, Theodor R, Dingemanse J. Almorexant effects on CYP3A4 activity studied by its simultaneous and time-separated administration with simvastatin and atorvastatin. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013;69(6):1235-45.
51. Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;271(1):549-56.
52. Eeckhoudt SL, Desager JP, Robert AR, et al. Midazolam and cortisol metabolism before and after CYP3A induction in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2001;39(7):293-9.
53. al-Hawasli H, al-Khayat MA, al-Mardini MA. Development of a validated HPLC method for the separation and analysis of a Bromazepam, Medazepam and Midazolam mixture. *J Pharm Anal*. 2012;2(6):484-91.
54. Liu J, Jiang M, Li G, et al. Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction of sulfonamides from different matrices. *Anal Chim Acta*. 2010;679(1-2):74-80.
55. Rao RN, Prasad KG, Kumar KVS, Ramesh B. Diatomaceous earth supported liquid extraction and LC-MS/MS determination of elvitegravir and ritonavir in rat plasma: application to a pharmacokinetic study. *Anal Methods*. 2013;5(23):6693-9.
56. Biotage. ISOLUTE® SLE+ User Guide (Supported Liquid Extraction). 2014.
57. Scientific C. Solid Supported Liquid/Liquid Extraction 2013 [cited 14.04.15]. Available from: http://www.crawfordscientific.com/Sample_Preparation_Supported_Liquid_Extraction.html.
58. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Legemiddelanalyse. 2nd ed: Fagbokforlaget; 2010.
59. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
60. Korfmacher WA. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today*. 2005;10(20):1357-67.

61. Niessen WMA. State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *Am J Mod Chromatogr*. 1999;856(1-2):179-97.
62. Lemièrre F. Mass analysers for LC-MS. *LC GC Eur*. 2001;14(12):22-8.
63. Krueve A, Rebane R, Kipper K, et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. *Anal Chim Acta*. 2015;870(0):29-44.
64. Christensen H, Mathiesen L, Postvoll LW, et al. Different Enzyme Kinetics of Midazolam in Recombinant CYP3A4 Microsomes from Human and Insect Sources. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2009;24(3):261-8.
65. Brill ME, van Rongen A, Houwink AI, et al. Midazolam Pharmacokinetics in Morbidly Obese Patients Following Semi-Simultaneous Oral and Intravenous Administration: A Comparison with Healthy Volunteers. *Clin Pharmacokinet*. 2014;53(10):931-41.
66. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. 2011.
67. Ha H, Rentsch K, Kneer J, Vonderschmitt D. Determination of midazolam and its alpha-hydroxy metabolite in human plasma and urine by high-performance liquid-chromatography. *Ther Drug Monit*. 1993;15(4):338-43.
68. Ghassabian S, Moosavi SM, Valero YG, et al. High-throughput assay for simultaneous quantification of the plasma concentrations of morphine, fentanyl, midazolam and their major metabolites using automated SPE coupled to LC-MS/MS. *J Chromatogr B*. 2012;903(0):126-33.
69. Kuhn F, Oehme M, Schleimer M. Performance and reliability of splitless microliter gradient pumps in a metabolic stability study using cytochrome P450/3A4 and capillary liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003;1018(2):203-12.
70. Svanstrom C, Hansson GP, Svensson LD, Sennbro CJ. Development and validation of a method using supported liquid extraction for the simultaneous determination of midazolam and 1'-hydroxy-midazolam in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2012;58:71-7.
71. Lauber R, Mosimann M, Buhrer M, Zbinden A. Automated-determination of midazolam in human plasma by high-performance liquid-chromatography using column-switching. *J Chromatogr B-Biomed Appl*. 1994;654(1):69-75.
72. Dudrick SJ, Daly JM, Castro G, Akhtar M. Gastrointestinal adaptation following small bowel bypass for obesity. *Ann Surg*. 1977;185(6):642-8.
73. Stock-Damgé C, Aprahamian M, Raul F, et al. Small-intestinal and colonic changes after biliopancreatic bypass for morbid obesity. *Scand J Gastroenterol*. 1986;21(9):1115-23.